

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA GLINSKI PESSOTTO

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E PESTICIDAS
ORGANOCLORADOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO**

CURITIBA

2013

ANDRESSA GLINSKI PESSOTTO

**EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E PESTICIDAS
ORGANOCOLORADOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto.

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Pessotto, Andressa Glinski

Efeitos de nanopartículas de prata e pesticidas organoclorados em macrófagos peritoneais de camundongo. / Andressa Glinski Pessotto. – Curitiba, 2013.

63 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Francisco Filipak Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Nanopartículas 2. Pesticidas - Toxicologia 3. Estresse oxidativo I. Título II. Filipak Neto, Francisco. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 615.9

TERMO DE APROVAÇÃO


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR


Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Simone Martins de Oliveira
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Daniel Bussolero
Instituto Federal do Paraná - IFPR


Suplente:

Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a mestranda **Andressa Glinski**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeitos de nanopartículas de prata e pesticidas organoclorados em macrófagos peritoneais de camundongos", são de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2013


Prof. Dr. Geraldo da Silva Tenreiro
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos e a cada um que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, permitindo-me um aprendizado gratificante.

Em especial, sou grata

Ao Prof^o. Dr. Francisco, pela confiança, disponibilidade e orientação nesse trabalho. Igualmente por todas as imensuráveis contribuições, paciência e incentivo.

Aos professores Ciro, Marco, Sonia, por todas as contribuições, dedicação e ensinamentos.

Ao Prof^o Emilien Pelletier, da *Université du Quebec à Rimouski*, por disponibilizar as nanopartículas utilizadas nesse trabalho.

Ao professor Sandro e à Carmen do Laboratório Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, pela colaboração.

À Vanessa, do Biotério, por sempre receber minhas requisições com um sorriso e separar prontamente os animais para meus experimentos.

À Marlene, secretária do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela disposição e cuidado.

Ao programa de Pós Graduação, aos professores que contribuíram para minha formação, em especial à professora Adriana Mercadante e Rubens Bertazolli Filho pelas considerações iniciais para esse trabalho. De forma particular, ao professor Daniel Bussolaro e à professora Simone Martins de Oliveira pelas valiosas contribuições. Também aos colegas do programa, que de alguma forma somaram para meu crescimento acadêmico.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos colegas de laboratório, Daniele, Ellie, Renata, Juliana, Ivaldete, Ana Luisa, Rodrigo, por todos os momentos de auxílio, aprendizado e amizade.

Aos ICs Cassio, Dandie e Izabela, por toda “ajudinha”, companhia e conversa ao longo dos experimentos. “Dan”, também por todo suporte em informática.

Ao Samuel, pela constante colaboração ao longo desse trabalho, pela paciência, auxílio, disponibilidade. Sobretudo pela sua serenidade, nos insucessos iniciais e nos momentos de dúvida e desespero.

À minha família, meu porto seguro, pelo apoio, estímulo, compreensão, paciência. De forma especial, à minha mãe, pelo amor, carinho, dedicação e por ser esse exemplo de vida.

Ao Diogo, meu querido esposo e companheiro, por toda compreensão, incentivo, auxílio, paciência, carinho e amor. Obrigada por me entender, me ajudar nesse momento e sempre me apoiar!

Sobretudo a Deus, pelo dom da vida, pela saúde, pela paz que me conforta nos momentos difíceis, pelo amor que me sustenta, pelas pessoas maravilhosas que encontrei ao longo do caminho e pelas oportunidades que me trouxeram até aqui, fato que me inclui em uma minoria privilegiada da sociedade, num mundo onde poucos têm a alegria de estar próximo à arte do saber.

RESUMO

A nanotecnologia vem ocupando um lugar de destaque na economia e na ciência, devido às propriedades benéficas de nanomateriais em campos industriais, farmacêuticos e médicos. No entanto, estudos têm mostrado que as nanopartículas apresentam riscos para os organismos, devido às suas propriedades pró-oxidantes e capacidade para adsorver vários produtos químicos. Por conseguinte, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de nanopartículas de prata, pesticidas organoclorados e da associação entre ambos em macrófagos peritoneais de camundongo. Para isso, os macrófagos foram expostos às nanopartículas de prata em três concentrações (30, 300 e 3000 ng.ml⁻¹), duas concentrações de pesticidas organoclorados (30 e 300 ng.ml⁻¹) e a associação destes dois poluentes nas seis combinações possíveis por 24 h. As nanopartículas de prata foram caracterizadas quanto ao tamanho e dispersão por DLS, microscopias eletrônicas de transmissão e varredura acoplada ao sistema EDS, e se apresentaram parcialmente dispersas com mais de 55% do material com tamanho inferior a 100 nm. A maior concentração de nanopartículas de prata foi altamente citotóxica (demonstrado pelos ensaios do azul de tripan, vermelho neutro e MTT) e resultou em alterações morfológicas, aumento dos níveis de óxido nítrico, e redução das espécies reativas oxigênio e do índice fagocítico. No entanto, a associação de maiores concentrações de nanopartículas com os pesticidas apresentou efeitos mais pronunciados ou diferentes dos observados após exposição às nanopartículas isoladas. Esses efeitos da associação ficaram claros para os níveis de óxido nítrico e atividade fagocítica (maiores na associação), bem como para viabilidade celular pelo ensaio do azul de tripan e espécies reativas de oxigênio (menor na associação). Assim, este trabalho demonstra que a associação dos dois xenobióticos conduz a efeitos que não são observados ou previsíveis pela exposição isolada.

Palavras-chave: nanopartículas de prata, pesticidas organoclorados, macrófagos peritoneais de camundongo, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Nanotechnology has been occupying a prominent space in economy and science due to the beneficial properties of nanomaterials in industrial, pharmaceutical and medical fields. However, studies have shown that nanoparticles pose risks to organisms, due to their prooxidant properties and ability to adsorb several chemicals. Therefore, the aim of the current study was to evaluate the effects of silver nanoparticles, organochlorine pesticides and the association between them in mouse peritoneal macrophages. For this, macrophages were exposed to three concentrations of silver nanoparticles (30, 300 and 3000 ng.ml⁻¹), two concentrations of organochlorine pesticides (30 and 300 ng.ml⁻¹) and the association of these two pollutants at the six possible combinations for 24 h. The silver nanoparticles were characterized by DLS size and dispersion, electron microscopy and scanning system coupled to EDS, and stood partially dispersed over 55% of the material with size less than 100 nm. The highest concentration of silver nanoparticles was highly cytotoxic (trypan blue test, neutral red and MTT) and resulted in morphological changes, increased levels of nitric oxide and reduction of reactive oxygen species and the phagocytic index. However, the higher concentration of the association of nanoparticles and pesticide showed more pronounced effects than those observed after exposure to the isolated nanoparticles. These effects of the combination were clear for the nitric oxide levels and phagocytic activity (higher in the association) as well as for cell viability by trypan blue assay and reactive oxygen species (lower in the association). Thus, this work demonstrates that the association of the both xenobiotics leads to effects that are not observed or predicted by isolate exposure.

Keywords: silver nanoparticles, organochlorine pesticides, mouse peritoneal macrophages, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Alvos intracelulares das nanopartículas e mecanismos envolvidos.....	19
Figura 02. Histograma da distribuição do tamanho das nanopartículas de prata.....	35
Figura 03. Viabilidade celular utilizando o método de exclusão de Azul de tripan após 24h de exposição.....	36
Figura 04. Viabilidade celular utilizando o método de exclusão de Azul de tripan após 24h de exposição.....	37
Figura 05. Viabilidade celular utilizando o método de retenção do Vermelho Neutro após 24h de exposição.....	38
Figura 06. Viabilidade celular utilizando o método MTT após 24h de exposição.....	39
Figura 07. Acúmulo de sais de formazam em macrófagos peritoneais.....	39
Figura 08. Níveis de ERONs produzidos após 24 h de exposição.....	40
Figura 09. Níveis de NO ₂ produzidos após 24 h de exposição,.....	41
Figura 10. Índice da atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais de camundongo na presença de leveduras, após 24 h de exposição.....	42
Figura 11. Ensaio de fagocitose após 24 h de exposição aos poluentes.....	42
Figura 12. Macrófagos expostos por 24 h observados sob Microscopia Eletrônica de Varredura.....	43
Figura 13. Detalhe da cultura de macrófagos, observados sob Microscopia Eletrônica de Varredura, após 24 h de exposição.....	44
Figura 14. Agregado de Nanopartículas de prata sob Microscopia Eletrônica de Varredura.....	45
Figura 15. Nanopartículas de prata analisadas com o sistema EDS.....	46
Figure 16. Nanopartículas de prata e agregados vistos sob MET.....	47
Figura 17. Indícios de Nanopartículas de Prata em macrófagos.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Grupos experimentais e concentrações utilizadas.....	26
Tabela 02. Componentes e concentrações da mistura de pesticidas organoclorados.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

DAN - diaminonaphtalene

DCF - diclorofluoresceína

DDT – diclorodifeniltricloroetano

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDS – do inglês - *energy dispersive x-ray detector*

EROs – espécie(s) reativa(s) de oxigênio

HCB – Hexaclorobenzeno

H₂DCFDA – diclorofluoresceína diacetato

HEPES – do inglês *N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid*

MET - microscopia eletrônica de transmissão

MEV - microscopia eletrônica de varredura

MTT – do inglês - (3 - [4, 5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio)

NO – do inglês - *nitric oxide*

NO₂ – nitrito

npAg – nanopartículas de prata

PBS - tampão fosfato salino (do inglês *phosphate buffer saline*)

pCO₂ – pressão parcial de CO₂

PdI - Índice de Polidispersão

POC – pesticida(s) organoclorado(s)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Pesticidas Organoclorados	13
1.2 Nanopartículas	15
1.3 Macrófagos	20
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Obtenção e cuidado dos animais	24
3.2 Obtenção das células	24
3.3 Cultivo dos macrófagos	24
3.4 Desenho experimental	25
3.5 Caracterização das Nanopartículas	27
3.6 Testes de viabilidade celular	28
3.6.1 <i>Azul de tripan</i>	28
3.6.2 <i>Incorporação e retenção do Vermelho Neutro</i>	28
3.6.3 <i>MTT</i>	29
3.7 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs)	30
3.8 Detecção de Nitrito (NO ₂)	30
3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV – EDS	31
3.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	31
3.11 Capacidade fagocítica	32
3.12 Análises dos dados	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Caracterização das nanopartículas	34
4.2 Viabilidade Celular	36
4.2.1 <i>Exclusão do Azul de tripan</i>	36
4.2.2 <i>Retenção do Vermelho Neutro</i>	38
4.2.3 <i>MTT</i>	38
4.3 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs)	40
4.4 Detecção de Nitrito (NO ₂)	40
4.5 Atividade fagocítica	41
4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV – EDS	42
4.7 MET	47
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas sofrem intenso impacto de vários produtos gerados pela atividade humana: esgoto, agrotóxicos, despejos industriais, dentre outras. Desde a revolução industrial até os dias atuais, os contaminantes antropogênicos vêm se tornando mais diversificados, abundantes e dispersos no ambiente, o que aumenta a preocupação em preservar e manter a qualidade dos ecossistemas naturais. Devido a isso, vários estudos têm sido realizados visando o aprimoramento e desenvolvimento de metodologias para uma melhor compreensão do potencial tóxico de contaminantes no ambiente, uma vez que estes podem levar a perturbações metabólicas e ao comprometimento de processos fisiológicos vitais (STEGEMAN *et al.*, 1992). Além disso, muitas substâncias poluidoras causam problemas particulares para o ambiente, visto que apresentam, ao mesmo tempo, toxicidade, persistência e bioacumulação na cadeia alimentar.

1.1. Pesticidas Organoclorados

Os pesticidas organoclorados (POCs) estão entre os poluentes mais utilizados no século XX, e também entre os mais tóxicos. Contudo, foram amplamente liberados no ambiente natural. POCs são poluentes organopersistentes, intensamente usados para fins agrícolas nas décadas de 60 a 80 e estão distribuídos amplamente em todo o mundo, mesmo em locais remotos, como a Antártica, Ártico, Himalaia etc (HUNG *et al.*, 2002 e CHENG *et al.*, 2007). Devido à sua lipofilicidade, potencial de bioacumulação, meia-vida longa no ambiente e transporte por longas distâncias, eles estão entre os contaminantes mais prevalentes e podem ser encontrados na água (ABBASSY *et al.*, 1999; POWER *et al.*, 1999; CALDAS *et al.*, 1999), solo (PILIDIS *et al.*, 1996; MURAYA *et al.*, 1997) ou alimento (NEWSOME *et al.*, 1998; SCHADE e HEINZOW, 1998) até mesmo décadas após seu banimento.

Como consequência de seu caráter hidrofóbico, esses pesticidas acumulam-se nos organismos vivos e sua biomagnificação ao longo da cadeia alimentar pode ocorrer (NOBLE, 1993; SPACIE *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 1999).

A toxicidade dessa classe de compostos vem do fato de serem estruturalmente diferentes das substâncias normalmente encontradas na natureza e,

portanto, alguns organismos contaminados não têm capacidade de metabolizá-los eficientemente para sua eliminação, causando sua acumulação (BAIRD, 2002).

A estabilidade química da maioria dos compostos organoclorados usados como pesticidas ou para outros fins tornou-se, em longo prazo, um problema ambiental. A concentração desses poluentes no ambiente aumentou numa razão maior que a taxa de degradação. Vários foram os estudos que detectaram a presença não apenas desses compostos, mas também de seus metabólitos, que podem ser igualmente ou mais tóxicos (BLUS, 1995).

O DDT é o mais conhecido dentre os inseticidas do grupo dos organoclorados, sendo considerado uma das substâncias sintéticas mais utilizadas e estudadas no século XX (MENOME *et al.*, 2000). Foi utilizado na Segunda Guerra Mundial para prevenção de tifo em soldados que o utilizavam na pele para o combate a piolhos. Posteriormente foi usado na agropecuária, dado seu baixo custo e elevada eficiência (PARDI *et al.*, 1993). Sua descoberta revolucionou os conceitos de luta contra malária. Sua eficácia contra formas adultas dos mosquitos e seu prolongado efeito residual fizeram com que no período de 1946-1970 todos os programas de controle se apoiassem em seu emprego (REY, 1991). No início dos anos 60, aproximadamente 400 mil toneladas de DDT foram usadas anualmente no mundo todo (70 – 80% das quais usadas na agricultura) (TURUSOV *et al.*, 2002). No Brasil, entre 1962 e 1982, a produção de DDT total estimada foi aproximadamente 74 mil toneladas (RUDGE *et al.*, 2012). Apenas na década de 70 verificou-se que o DDT persistia no ambiente mesmo depois de vários anos após aplicação, e que ele se acumula no organismo dos animais. Isto ocorre porque ele é pouco solúvel em água, mas solúvel em gorduras (D'AMATO, TORRES e MALM, 2002). Além do DDT, outras substâncias com propriedades inseticidas foram vastamente utilizadas na agricultura, com efeitos toxicológicos semelhantes, como aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, clordano (QUINETE, 2005).

Desde 1985, a utilização de inseticidas organoclorados tem sido severamente restrita no Brasil. Entretanto, o DDT e o γ -HCB continuaram sendo utilizados no controle de vetores de doenças tropicais, como a malária (GUO, 2008), febre amarela, dengue e leishmaniose. Somente em maio de 2009, o então presidente, Luiz Inácio Lula da Silva assinou a lei nº 11.936/09, que proíbe a fabricação, importação, exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e

o uso do DDT (http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/Lei/L11936.htm).

Os pesticidas tornaram-se foco de pesquisas toxicológicas desde que o estudo do estresse oxidativo como um possível mecanismo de toxicidade passou a ser associado a algumas patologias humanas como câncer, imunossupressão e doenças neurodegenerativas (BANERJEE *et al.*, 2001; KONER *et al.*, 1998; MAYNE, 2003; PONG, 2003).

1.2 Nanopartículas

Atualmente, uma nova e ampla classe de contaminantes produzidos pelo homem – as nanopartículas – são cada vez mais comuns nos ambientes naturais, visto que as atividades industriais envolvendo a nanotecnologia crescem de modo acelerado. Dessa forma, rejeitos industriais tendem a atingir facilmente os corpos d'água, sendo inevitável que rejeitos nanotecnológicos também alcancem com facilidade o ambiente (HOWARD, 2004; ROYAL SOCIETY e ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

Uma nanopartícula é definida como uma pequena partícula com pelo menos uma dimensão na faixa de 1 a 100 nm que se comporta como uma unidade inteira em termos de transporte e propriedades. A nanotecnologia baseia-se no fato de que quando um material sólido torna-se muito pequeno, há um aumento da área de superfície, o que leva a um aumento também de sua reatividade e efeitos relacionados. Ademais, as propriedades físicas e químicas dos nanomateriais podem tornar-se muito diferentes daqueles materiais de mesma composição e maior volume (EPA, 2010). Assim, seus benefícios precisam ser pesados com todo o custo potencial para o ambiente e para a saúde pública, pois as propriedades específicas e o pequeno tamanho das nanopartículas podem torná-las tóxicas aos seres vivos. Estudos têm demonstrado que o tamanho das nanopartículas é crucial para sua internalização (LIMBACH *et al.*, 2005), normalmente por endocitose, e, deste modo, a toxicidade também está relacionada a essa característica (FUJIWARA *et al.*, 2008; CARLSON *et al.*, 2008).

Os efeitos desconhecidos sobre a saúde e riscos associados a esses materiais têm atraído a atenção dos pesquisadores, consumidores e órgãos reguladores. Cientistas da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) e de outras Instituições têm reconhecido a necessidade de se desenvolver processos de

avaliação de risco para o estudo dos impactos potenciais para saúde e ambiente da fabricação dos nanomateriais, bem como seu transporte e utilização em outros produtos (EPA, 2010).

Embora as aplicações de nanopartículas continuem aumentando globalmente em todos os campos, as preocupações com seus impactos ambientais e com a saúde continuam sem resposta. E ainda, as aplicações comerciais são acompanhadas por uma falta de regulamentação e de dados toxicológicos (ASHARANI, 2008).

Atualmente, o rastreamento de produtos que contêm nanopartículas é difícil, pois são numerosas as marcas, e os regulamentos de rotulagem atuais não exigem que os nanomateriais sejam listados como componentes (EPA, 2010).

Dentre os diversos tipos de nanopartículas, os nanometais vêm sendo muito empregados em processos industriais e em produtos de uso humano direto. De uma forma particular, as nanopartículas de prata (npAg) chamam a atenção devido a sua atividade antimicrobiana (EPA, 2010; SOTIRIOU e PRATSINIS, 2011). Dos mais de 1000 produtos de consumo que contêm nanomateriais, mais de um quarto deles contêm npAg. Estes incluem materiais de embalagem de alimentos (tais como copos, tigelas e tábuas de corte), suplementos alimentares, produtos têxteis, brinquedos e produtos infantis, eletrônicos, eletrodomésticos, cosméticos, dispositivos médicos (catéteres, curativos e até mesmo próteses ósseas), desinfetantes de água e sprays de ambiente (FAUSS, 2008; PARK *et al.*, 2011).

Algumas dessas aplicações de nanopartículas de prata resultam em preocupação para o governo e discussões entre o público, porque uma vez liberadas no ambiente, a mobilidade, biodisponibilidade e a toxicidade das nanopartículas em qualquer ecossistema é determinada em parte por sua estabilidade no meio ambiente. Um exemplo disso é a adição de npAg na fabricação de meias a fim de matar as bactérias associadas com o mau odor dos pés. Vários estudos têm mostrado que a prata pode facilmente ser lixiviada para águas residuais durante a lavagem e potencialmente perturbar bactérias úteis utilizadas em instalações de tratamento dessas águas e até mesmo colocar em perigo organismos aquáticos de lagos e rios. Da mesma forma, as npAg são tóxicas para os organismos aquáticos e terrestres, para uma variedade de células de mamíferos *in vitro* e podem ser prejudiciais para a saúde humana (EPA, 2010).

Os seres humanos estão expostos às npAg principalmente através da ingestão de água potável, de alimentos, através do contato da pele com vários produtos de consumo e de uso médico ou ainda por equipamentos de uso diário, tais como filtros de água e máquinas de lavar. A presença nesses produtos é preocupante, pois as npAg são lixiviadas facilmente para os corpos d'água. Uma vez no meio ambiente, há uma infinidade de formas pelas quais elas são transportadas. No entanto, surpreendentemente, há pouca ou nenhuma informação sobre o comportamento, em relação à mecanismos, das npAg no meio ambiente (EPA, 2010).

Os pulmões, brânquias pele e intestino são importantes vias de absorção de nanopartículas, e através de fenestrações, podem ser transportadas pela circulação, atingindo assim diversos tecidos e órgãos, incluindo o fígado, rins e cérebro (ARTELT *et al.*, 1999; TAKENAKA *et al.*, 2001; NEMMAR *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 2006). Há também relato de absorção de npAg após o uso de curativos para queimaduras revestidos com tal substância (TROP *et al.*, 2006).

Para estudos *in vitro* com npAg, a seleção do tipo celular que representa o tecido alvo é importante. As linhagens celulares estabelecidas são fáceis de manter e são preferidas na maioria dos estudos toxicológicos para uma melhor reprodutibilidade de dados. Entretanto, a questão referente às linhagens, no que tange à adequação de células-alvo apropriadas, tem sido frequentemente levantada em relação à relevância clínica (HANKS, 1996). Nesses casos, as células isoladas a partir de tecidos-alvo são desejáveis, de forma a simular a situação *in vivo*, de forma mais estreita.

Estudos demonstraram que nanopartículas de prata podem induzir citotoxicidade em células fagocíticas, tais como macrófagos peritoneais de camundongo, assim como em monócitos humanos (FOLDBJERG *et al.*, 2009; SOTO *et al.*, 2007).

Dentro da célula, as npAg têm como alvo primário as mitocôndrias, reduzindo os níveis de antioxidantes como glutathione e levando à peroxidação lipídica e fragmentação do DNA (ARORA *et al.*, 2008).

A estabilidade da membrana pode ser afetada diretamente por nanopartículas (danos físicos, por exemplo) ou indiretamente (por exemplo, a oxidação) o que pode levar à morte da célula. As nanopartículas podem prejudicar a capacidade das membranas de controlar a homeostase intracelular, por meio da

permeabilidade seletiva e mecanismos de transporte. Interações de nanopartículas com membranas dependem em grande parte das propriedades de superfície das nanopartículas. Esta é a razão pela qual modificações da superfície são cruciais na concepção de sistemas de distribuição de drogas via nanopartículas para as células (VASIR e LABHASETWAR, 2008). Embora a geração de espécies reativas de oxigênio pelas nanopartículas possam danificar as membranas (RODEA-PALOMARES *et al.*, 2011), as propriedades físico-químicas das nanopartículas parecem ser predominantemente responsáveis por mudanças na morfologia da membrana e na sua estabilidade (GINZBURG e BALIJEPALLI, 2007). As mitocôndrias parecem ser um alvo importante para os fulerenos (FOLEY *et al.*, 2002), nanotubos de carbono (ZHU *et al.*, 2006), dióxido de titânio, nanotubos de poliestireno e de prata (HUSSAIN *et al.*, 2005; XIA *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2005). Outro compartimento intracelular preferencial são os lisossomos, organelas envolvidas na digestão intracelular. Neste compartimento poderia, em princípio, haver digestão ou excreção (GREULICH *et al.*, 2011; AL-RAWI *et al.*, 2011), embora essas interações com os lisossomos não sejam totalmente compreendidas. No pH ácido dos lisossomos, muitas nanopartículas podem liberar poluentes adsorvidos à sua superfície, funcionando como “Cavalos-de-Tróia”, permitindo a entrada de poluentes nas células (HURT *et al.*, 2006), os quais normalmente teriam problemas em atravessar a barreira imposta pela membrana plasmática. Nesse sentido, a citotoxicidade das AgNP através do mecanismo “Cavalo de Tróia” tem sido sugerida por vários estudos (LUOMA, 2008; LIMBACH *et al.*, 2007; LUBICK, 2008; PARK *et al.*, 2010). Finalmente, o núcleo usa os complexos do poro para transportar substâncias para dentro e para fora do núcleo. Algumas nanopartículas, geralmente as menores, parecem ser capazes de se difundir através destes poros (PARFENOV *et al.*, 2006; GODBEY *et al.*, 1999) ou ser transportadas via receptores nucleares (PANTE e KANN, 2002; HOSHINO *et al.*, 2004, WILLIAMS *et al.*, 2009). Além disso, acredita-se que as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) desempenham um papel-chave no dano ao DNA, de modo que as partículas não têm necessariamente de atingir o núcleo para induzir genotoxicidade (BHABRA *et al.*, 2009; MYLLYNEN *et al.*, 2009) - (Figura 01).

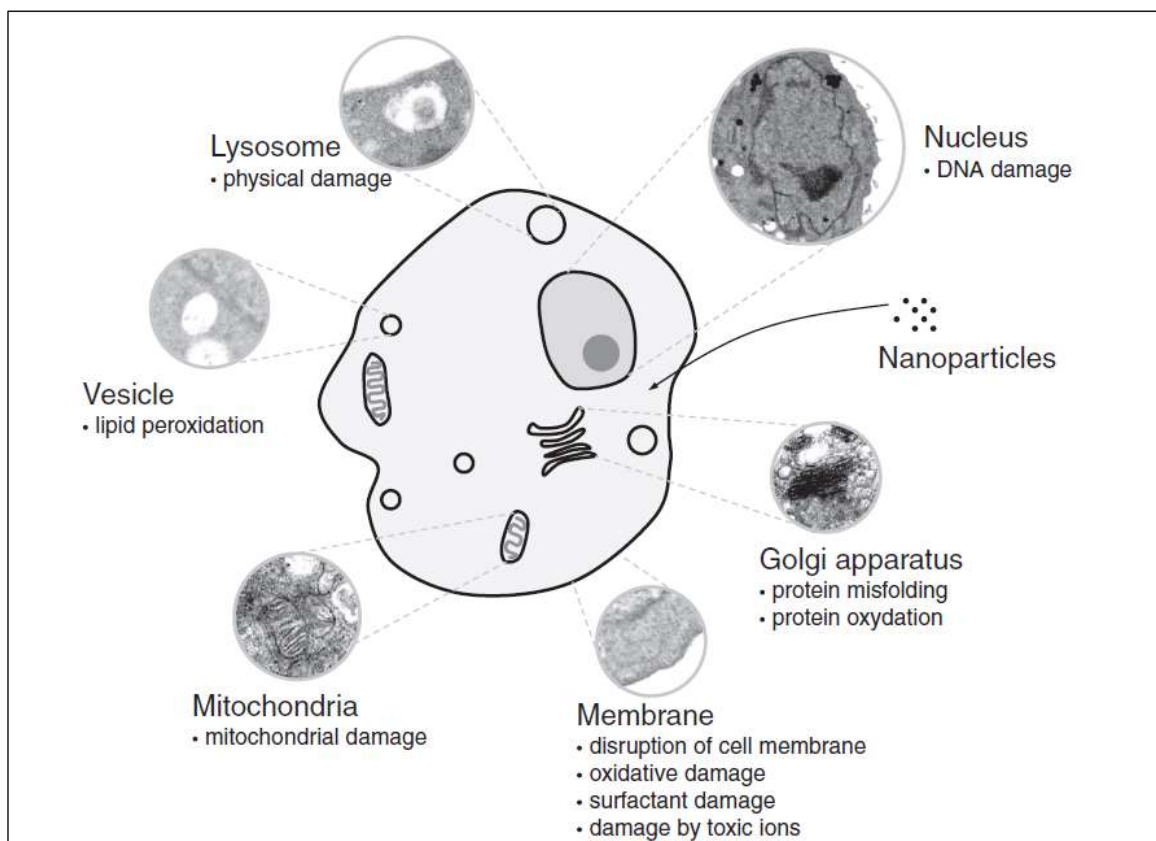


Figura 01. Alvos intracelulares das nanopartículas e mecanismos envolvidos.
 FONTE: ELSAESSER e VYVYAN HOWARD (2012).

Em nanotoxicologia, a dose/concentração é um parâmetro importante para avaliar a relevância e legitimar experimentos *in vitro* e *in vivo* para avaliação de risco de saúde pública. Isso significa que nanotoxicologistas devem testar a toxicidade das nanopartículas baseadas no que poderia ser encontrado no ambiente ao invés de doses excessivamente altas destinadas ao conhecimento da resposta biológica por si (ELSAESSER e VYVYAN HOWARD, 2012). Assim, experimentos com inalação de baixas doses são preferíveis por serem muito mais preditivos de dano humano (OBERDÜRSTER, 2000). Os estudos normalmente apontam para uma baixíssima toxicidade de concentrações ambientalmente relevantes de npAg. Contudo, a coexposição com outros poluentes deve ser considerada, pois os efeitos causados em exposições individuais já são bem conhecidos. No entanto, as investigações envolvendo algumas combinações de xenobióticos (efeitos de interações) são mais raras dadas às dificuldades impostas quando o foco é o efeito de um conjunto de substâncias, o que representa, de fato, a situação mais próxima do encontrado no ambiente natural. Por isso, os estudos de risco envolvendo nanopartículas não devem focar unicamente na toxicidade inerente às

nanopartículas, mas também considerar as possíveis interações das mesmas com poluentes já existentes no ambiente (BAUN *et al.*, 2008).

No ambiente natural, os organismos encontram-se expostos a misturas complexas, difíceis de serem avaliadas do ponto de vista toxicológico, mas que constituem um desafio eminente e constante para os pesquisadores que atuam nesta área.

1.3 Macrófagos

O modelo experimental selecionado para o presente estudo são os macrófagos peritoneais de camundongo, células fagocitárias que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos (BABIOR, 2000). Eles se originam na medula óssea, circulam no sangue, amadurecem e tornam-se ativados em vários tecidos. São chamados de monócitos ao deixar a medula óssea e ao entrar no sangue periférico. Nos tecidos, eles amadurecem e tornam-se macrófagos. Eles podem residir no tecido conjuntivo subepitelial (células de Langerhans), no interstício dos órgãos parenquimatosos, no revestimento dos sinusóides vasculares do fígado (células de Kupffer) e do baço, e nos seios linfáticos dos linfonodos (KRISHNATRY *et al.*, 2009; BEUTLER, 2004; MA *et al.*, 2003), possuindo a capacidade de reconhecer e endocitar agentes estranhos ao organismo. Eles são especialmente abundantes em áreas que apresentam um potencial maior de sofrer algum tipo de invasão por parte de agentes estranhos como os pulmões e o intestino (ALBERTS *et al.*, 2004). Eles constituem cerca de 10-15% das células totais do corpo. Esses fagócitos mononucleares têm pelo menos três funções: apresentação de antígenos, fagocitose (defesa celular e eliminação de restos celulares) e imunomodulação (DALE *et al.*, 2008).

Os macrófagos foram primeiramente descritos por METCHNIKOFF, no início do século XIX. Morfologicamente, são células com núcleo irregular e excentricamente posicionado, um ou mais nucléolos e cromatina pouco condensada. Sua superfície celular é bastante irregular, sendo dotada de inúmeras projeções citoplasmáticas. Apresentam vários complexos de Golgi, grande número de lisossomos e mitocôndrias e um citoesqueleto bem desenvolvido, rodeando o núcleo da célula e estendendo-se até a periferia da mesma (AUGER e ROSS, 1992).

Macrófagos residentes no tecido foram previamente chamados de macrófagos fixos e aqueles que se desenvolviam como resultado de um estímulo

exógeno e migravam para sítios particulares foram denominados macrófagos livres. Esses nomes têm sido substituídos por macrófagos residentes e macrófagos ativados, respectivamente (GARTNER e HIATT, 1997).

Macrófagos ativados são um pouco maiores que os não ativados, principalmente devido ao aumento de volume citoplasmático (STITES e TERR, 1992) associado ao aumento da atividade metabólica, motilidade e capacidade fagocítica (GORDON *et al.*, 1988; ERWIG *et al.*, 1998) sendo muito mais eficientes em destruir bactérias e outros patógenos.

Uma vez ativados, os macrófagos podem então realizar a fagocitose, um processo de englobamento de partículas grandes dependente do citoesqueleto, mediado por receptores específicos expressos na superfície celular. O fagócito utiliza os receptores de superfície para se ligar a um microorganismo e envolvê-lo, formando uma vesícula chamada fagossomo. Os receptores de superfície também liberam sinais que estimulam a fusão dos fagossomos com os lisossomos. Desta forma, o fagossomo é acidificado pela fusão com vesículas proveniente do *trans*-golgi contendo lisozima e hidrolases ácidas capazes de degradar o conteúdo fagocitado. Além disso, o complexo NAPH oxidase é ativado nas membranas, catalisando a produção de espécies reativas (SASSADA, *et al.*, 1983). As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e outras espécies radicalares e não radicalares que são agentes oxidantes ou facilmente convertidos em radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CADENAS e CADENAS, 2002), enquanto que as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) incluem o radical óxido nítrico ($NO\cdot$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (FORMAN e TORRES, 2001). A produção desses compostos tóxicos é acompanhada pelo aumento temporário do consumo de oxigênio pelas células, chamado de “burst”/explosão respiratória (ALBERTS *et al.*, 2004), que tem como função fornecer espécies reativas que atuam na defesa do organismo, como sinalizadores intercelulares e segundos mensageiros nas vias de sinalização dos macrófagos (NYGREN *et al.*, 2001; FORMAN e TORRES, 2001; RETH, 2002; BEUTLER, 2004). Os produtos obtidos do “burst” respiratório, como o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , não são por si só oxidantes reativos, mas são substratos para geração de outras espécies reativas de oxigênio mais violentas, particularmente as radicalares por possuírem um ou mais elétrons desemparelhados, os quais podem formar espécies

altamente reativas (BEUTLER, 2004) capazes de destruir os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular.

O óxido nítrico (NO^\cdot), reativo intermediário de nitrogênio, é produzido por macrófagos ativados e pode ser produzido por outros tipos celulares, tais como, células endoteliais vasculares, neurônios, células epiteliais do trato respiratório, fibroblastos, hepatócitos (SONG *et al.*, 2002). O NO^\cdot é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons no nitrogênio e oito no oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. O NO^\cdot produzido pelos macrófagos desenvolve um papel importante em processos patológicos, como a defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (MACMICKING *et al.*, 1997; KRISHNATRY *et al.*, 2009). É o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a molécula mais importante reguladora do sistema imune.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar os efeitos de nanopartículas de prata isoladamente e associadas a pesticidas organoclorados em macrófagos peritoneais de camundongo.

Objetivos Específicos

Caracterizar química e morfológicamente as nanopartículas de prata utilizadas nesse trabalho;

Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de prata, pesticidas organoclorados e associação de ambos os contaminantes após exposição *in vitro* através dos ensaios de viabilidade celular, exclusão do azul de tripan, MTT e vermelho neutro;

Avaliar as alterações no ambiente redox através da quantificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após exposição;

Avaliar a morfologia celular após exposição através de microscopia eletrônica de varredura;

Verificar a atividade fagocítica dos macrófagos após exposição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cuidado dos animais

Camundongos *Swiss Mus musculus* (Linné, 1758) machos, com 2 a 3 meses de idade, foram obtidos no Biotério da Universidade Federal do Paraná, e mantidos em condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo controlado de 12 h claro/escuro) e alimentados *ad libitum* com ração comercial e água filtrada.

3.2 Obtenção das células

Para obtenção das células, os animais foram mortos por deslocamento cervical e em seguida presos a um suporte de isopor¹. Etanol 70% foi borrifado para desinfecção dos pelos. A pele ventral foi levantada com o auxílio de duas pinças dente-de-rato e foi puxada em direções contrárias para que esta fosse rompida e o peritônio exposto. A seguir, 10 ml de PBS (tampão fosfato salino, pH 7,4), estéril, a 4°C foram injetados na cavidade peritoneal. Após agitar a solução salina no interior do peritônio, através de leves batidas no abdômen, para que os macrófagos presos na parte interna se soltassem, a solução contendo macrófagos (lavado intraperitoneal) foi aspirada com o auxílio de seringa e agulha, transferida para um tubo estéril e acondicionado em gelo (BUSSOLARO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

3.3 Cultivo dos macrófagos

Um *pool* de macrófagos de pelo menos dez camundongos foi utilizado para cada experimento. O *pool* dos macrófagos obtido dos lavados peritoneais foi centrifugado a 1500 rpm por 4 min. Em fluxo laminar, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspenso em meio de cultivo RPMI 1640 a 4°C. Uma alíquota de 20 µl da suspensão celular foi retirada do tubo e adicionada a 20 µl do corante azul de tripan a 0,4% e misturados. Após 1 min, aproximadamente 200 células foram classificadas visualmente em células viáveis e não viáveis em uma câmara de *Neubauer*. Diante da viabilidade, o volume da suspensão foi ajustado de forma a se obter $2,0 \times 10^6$ células viáveis por mililitro, que foram semeadas em

¹ Todo o procedimento referente à utilização dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR), protocolo nº 617.

microplacas de 96 poços ($2,0 \times 10^5$ células/poço) e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 em incubadora, por 15 – 20 min, para a seleção por adesão. Após esse período, o sobrenadante com células não aderidas foi substituído por meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com $2,2 \text{ g.l}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ de HEPES, 10% de soro bovino fetal e antibióticos ($1 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ de estreptomicina, $2,5 \text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$ de anfotericina B e 10 U.ml^{-1} de penicilina) e as células foram novamente incubadas por 24 h. Em seguida, as células foram expostas aos poluentes por mais um período de 24 h - período de exposição (BUSSOLARO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes. Assim, para cada análise, foram utilizados pelo menos três *pools* diferentes de macrófagos (3 réplicas).

3.4 Desenho experimental

Com base no modelo de MUELLER e NOWACK (2008), que indica quantidades de nanopartículas previstas no ambiente com o uso de dezenas a centenas de nanogramas por litro em água, selecionamos uma concentração 1000X superior à esperada no ambiente como concentração-teste mais baixa, pressupondo uma possível bioacumulação nos tecidos e células, como comumente acontece com poluentes não metabolizados ou de difícil excreção. A partir desta concentração, estabelecemos as duas outras. Desta forma, as células foram expostas a três concentrações diferentes de nanopartículas de prata, a duas concentrações de pesticidas organoclorados (selecionados com base nos valores encontrados em tecidos animais), e às misturas de ambos, acompanhado de um grupo controle (não exposto aos xenobióticos), como demonstrado na tabela 01.

Tabela 01. Grupos experimentais e concentrações utilizadas

Grupo experimental	Concentração em meio de cultura
Controle	0 ng.ml ⁻¹
N1	3,0 x 10 ¹ ng.ml ⁻¹
N2	3,0 x 10 ² ng.ml ⁻¹
N3	3,0 x 10 ³ ng.ml ⁻¹
P1	3,0 x 10 ¹ ng.ml ⁻¹
P2	3,0 x 10 ² ng.ml ⁻¹
N1 + P1	3,0 x 10 ¹ ng.ml ⁻¹ + 3,0 x 10 ¹ ng.ml ⁻¹
N1 + P2	3,0 x 10 ¹ ng.ml ⁻¹ + 3,0 x 10 ² ng.ml ⁻¹
N2 + P1	3,0 x 10 ² ng.ml ⁻¹ + 3,0 x 10 ¹ ng.ml ⁻¹
N2 + P2	3,0 x 10 ² ng.ml ⁻¹ + 3,0 x 10 ² ng.ml ⁻¹
N3 + P1	3,0 x 10 ³ ng.ml ⁻¹ + 3,0 x 10 ¹ ng.ml ⁻¹
N3 + P2	3,0 x 10 ³ ng.ml ⁻¹ + 3,0 x 10 ² ng.ml ⁻¹

N - Nanopartículas de Prata; P - Pesticidas organoclorados.

Todos os grupos receberam DMSO (Dimetil Sulfóxido) na concentração final de 0,05%, pois a mistura de pesticidas encontrava-se diluída nesse veículo.

Estimativa da concentração de npAg encontrada na água (PÉREZ *et al.*, 2009) é de 0.03 ng.ml⁻¹.

Concentração de POCs encontrada em tecidos de peixes (RABITTO *et al.*, 2010; MIRANDA *et al.*, 2008)

As Nanopartículas de Prata utilizadas nesse estudo foram sintetizadas no *Institut des Sciences de La Mer–Université du Québec à Rimouski - Quebec - Canadá*; e a mistura de pesticidas organoclorados (organochlorine pesticides mixture, EPA 8080) foi obtida da empresa Sigma-Aldrich. Os componentes e as concentrações da mistura de pesticidas organoclorados seguem discriminados na tabela 02.

Tabela 02. Componentes e concentrações da mistura de pesticidas organoclorados utilizadas.

Componente	P1	P2
α -BHC	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
β -BHC	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Lindane	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
δ -BHC	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Aldrin	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
6-Hydroxy-2-naphthyl disulfide	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
1,1-Dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethene	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
4,4'-DDT	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Dieldrin	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
α -Endosulfan	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
β -Endosulfan	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Endosulfan sulfate	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Endrin	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Endrin aldehyde	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Heptachlor	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Heptachlor exo-epoxide	1,5 ng.ml ⁻¹	15 ng.ml ⁻¹
Methoxychlor	6,0 ng.ml ⁻¹	60 ng.ml ⁻¹
Σ	30 ng.ml ⁻¹	300 ng.ml ⁻¹

3.5 Caracterização das Nanopartículas

As propriedades físico-químicas (tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta) das nanopartículas em meio de cultura (meio de exposição às células), e em água (meio em que as nanopartículas estavam dispersas), foram caracterizadas usando Zetasizer Nano® - Malvern no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG. O diâmetro médio de partículas foi medido pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS – *Dinamic Light Scattering*).

O Índice de Polidispersão é um parâmetro para definir a distribuição do tamanho das partículas. É calculado da análise da função de autocorrelação em medidas de espalhamento dinâmico de luz. Nesta análise, assume-se que as partículas possuem um único tamanho e um ajuste exponencial simples é aplicado à função de autocorrelação (MALVERN, 2009). É um número dimensional que entre

valores de 0-0,1 até 0,5-0,7 representa partículas monodispersas. As amostras com distribuição de tamanho muito amplo tem valores de índice polidispersibilidade $> 0,7$.

Já o Potencial Zeta é uma das principais forças que regulam as interações interpartículas. A maioria das partículas dispersas em um sistema aquoso adquire carga na superfície, principalmente por ionização de grupos ou adsorção de espécies carregadas. As cargas da superfície modificam a distribuição dos íons na interface, resultando em uma camada ao redor da partícula diferente da solução. Partículas com alto Potencial Zeta e mesmo sinal de carga, seja positivo ($> +30$ mV) ou negativo (< -30 mV), tendem a se repelir. Dessa forma, um alto Potencial Zeta, confere estabilidade, isto é, a solução/dispersão terá menor tendência à agregação (MALVERN, 2009).

3.6 Testes de viabilidade celular

Três testes de viabilidade celular foram realizados: o teste de exclusão do azul de tripan, o teste do vermelho neutro e o teste do MTT para avaliar a citotoxicidade dos contaminantes ao término do período de exposição.

3.6.1 Azul de tripan

Esse método utiliza como princípio a exclusão do corante vital azul de tripan (PHILLIPS, 1973). É composto pelo corante que penetra no interior de células que perderam a integridade da membrana plasmática. Assim, é possível detectar células não viáveis, cuja membrana, por apresentar danos, permite a incorporação do corante, corando-se de azul. Por outro lado, como a integridade da membrana é pré-requisito para viabilidade celular, as células viáveis não são coradas (RIBEIRO *et al.*, 2003). Para esse teste, após o período de exposição aos contaminantes, o corante azul de tripan (0,04%, Sigma[®]) foi adicionado aos poços da microplaca, que em seguida foi levada ao microscópio invertido para a captura de imagens. A análise foi feita a partir de 30 imagens (10 replicatas por experimento em três experimentos independentes), com um número mínimo de 100 células por imagem para cada grupo experimental.

3.6.2 Incorporação e retenção do Vermelho Neutro

O teste do vermelho neutro é uma análise colorimétrica para quantificação da atividade lisossômica de células em resposta a compostos estranhos. O ensaio

baseia-se na capacidade das células viáveis de incorporar e assimilar o vermelho neutro dentro dos lisossomos. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra prontamente na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos (devido ao baixo pH), onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica (SVENDSEN *et al*, 2004). Mudanças na membrana lisossômica levam à fragilidade lisossômica e outras mudanças que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações ocorridas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da absorção e assimilação do Vermelho Neutro. Assim, é possível distinguir células viáveis de danificadas ou mortas. A quantidade de corante incorporado às células é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta. Para a realização desse teste, as células receberam 200 µl de meio de cultura contendo 50 µg.ml⁻¹ de vermelho neutro 3 h antes do final do tempo de exposição aos contaminantes (24 h) e foram incubadas em estufa a 37 °C e pCO₂ de 5%. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados três vezes com solução contendo formol (15% em água) e cloreto de cálcio (100 g.l⁻¹) para remoção do corante não incorporado e fixação das células. Em seguida, foram adicionados 300 µl de solução de ácido acético a 1% e etanol a 50% aos poços para extração do corante. Após 15 min, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado para ressuspensão do corante. O conteúdo foi deixado em repouso por 5 min para a precipitação dos restos celulares e 200 µl do sobrenadante, sem restos celulares detectáveis visualmente, foram transferidos para outra microplaca para quantificação da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

3.6.3 MTT

O teste MTT é um método colorimétrico que se baseia na capacidade de células viáveis e metabolicamente ativas reduzirem enzimaticamente o MTT (3 - [4, 5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio) a sais de formazam de cor púrpura que podem ser quantificados por espectrofotometria após diluição com DMSO (REILLY *et al.*, 1998). Sendo as desidrogenases mitocondriais responsáveis pela reação de redução, para que esta reação ocorra há a necessidade de que a célula esteja viável e suas mitocôndrias funcionais.

Três horas antes do final do período da exposição ao contaminante, 20 µl da solução de MTT (5 mg.ml⁻¹) foi adicionada a cada poço e as microplacas permaneceram na incubadora a 37°C e pCO₂ de 5%. Ao final desse período, todo o

meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS. Os cristais insolúveis de formazan foram dissolvidos em 100 µl de DMSO e 100 µl de PBS foram adicionados aos poços. A absorbância foi detectada em espectrofotômetro a 560 nm.

3.7 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para detectar os níveis de EROs foi utilizado o marcador fluorescente diclorofluoresceína diacetato (H_2DCFDA), que se difunde passivamente nas células, é desacetilado ($DCFH_2$) e subsequentemente oxidado por EROs, originando 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente (HAUGLAND, 1996; BENOVA *et al.*, 1998).

Após o término do período de exposição aos contaminantes, o meio de cultura dos poços foi removido e 200 µl de meio de cultura contendo $10 \mu\text{moles.l}^{-1}$ de H_2DCFDA foi adicionado a cada micropoço. Passados 15 min de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e posteriormente foi adicionado em cada poço 300 µl de PBS para leitura em espectrofluorímetro (λ de excitação = 488 nm; λ de emissão = 530 nm).

Embora este método quantifique principalmente o peróxido de hidrogênio, ele não é totalmente específico para esta espécie reativa de oxigênio, podendo também quantificar o ânion superóxido.

Os dados dos níveis de EROs foram normalizados pela viabilidade celular obtida pelo método do azul de tripan, de forma a minimizar a interferência da redução da viabilidade de alguns grupos no ensaio.

3.8 Detecção de Óxido Nítrico (NO)

A determinação de óxido nítrico foi realizada como descrito por Misko *et al.*, 1993, com pequenas modificações.

Após 24 h de exposição das células aos contaminantes, foram adicionados 10 µl de 2,3-Diaminonaphthalene (DAN) ($0,05 \text{ mg.ml}^{-1}$ em HCl 0,62 M) a 150 µl do meio de reação. Após 30 min de incubação protegida da luz, a reação foi interrompida por 5 µl de NaOH 2,8 M. A formação de 1-H-naphthotriazole foi medida com um espectrofluorímetro, com comprimento de onda de excitação 365 nm e comprimento de onda de emissão de 450 nm.

Os dados também foram normalizados pela viabilidade celular obtida pelo método do azul de tripan, de forma a minimizar a interferência da redução da viabilidade de alguns grupos sobre o ensaio.

3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV – EDS

Para analisar a morfologia dos macrófagos e também das nanopartículas de prata, amostras foram observadas sob o Microscópio Eletrônico de Varredura.

Após cultivo dos macrófagos em lamínulas e 24 h de exposição aos xenobióticos, as células foram fixadas em solução de glutaraldeído 3% durante 1 h e preservadas em etanol a 70% a 4° C, desidratadas em série crescente de etanol 70, 80, 90, 95, 100, 100% (Merck®) por 5 min cada, saturadas de CO₂ líquido (ponto crítico) e metalizadas com ouro para observação sob o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Para visualizar as nanopartículas de prata, foi necessário “gotejar” uma solução concentrada de nanopartículas de prata ($9,0 \times 10^4 \text{ ng.ml}^{-1}$) repetidas vezes sobre o suporte de alumínio usado para verificar amostras. Após secar, este suporte foi levado ao microscópio eletrônico de varredura para captação de imagens, e fez-se uso do sistema de espectrometria de energia dispersiva de raios X – EDS, acoplado ao microscópio eletrônico de varredura, para constatar que a imagem obtida era realmente das nanopartículas.

O EDS (*energy dispersive x-ray detector*) é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais. Quando o feixe de elétrons incide sobre um material, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para sua posição inicial, liberam a energia adquirida em comprimento de onda no espectro de raios-x. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada a esse elétron. Como os elétrons de um determinado átomo possuem energias distintas, é possível, no ponto de incidência do feixe, determinar quais os elementos químicos estão presentes naquele local.

3.10 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a caracterização das nanopartículas de prata, análise ultraestrutural dos macrófagos e também à procura a presença das nanopartículas

intracelularmente, amostras de células foram processadas para análise através do microscópio eletrônico de transmissão (MET).

A solução mãe de nanopartículas de prata foi diluída em metanol 100% (1:1) e gotejada sobre tela de cobre recoberta previamente com carbono. Após a secagem da amostra, as telas foram levadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1200 EXI no Centro de Microscopia da Universidade Federal do Paraná.

Já os macrófagos foram cultivados em garrafas de cultura, e após o tempo de exposição foram fixados por 1 hora com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, lavados também em tampão cacodilato de sódio e pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% (BUSSOLARO, 2006) . Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de etanol (Merck®) e óxido de propileno, e incluídas em resina Poli Embed 812 (*Electron microscopy sciences*). Após polimerização em estufa a 60 °C por 72 h, os blocos foram trimados, cortes semi-finos foram realizados e corados com azul de toluidina borificado 1%. Em seguida, cortes ultrafinos foram obtidos com auxílio do ultramicrotomo. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila 5% durante 20 min e citrato de chumbo por 5 min.

3.11 Atividade fagocítica

Para analisar a atividade fagocítica um ensaio de fagocitose com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado em meio de cultura sem soro. Após as 24 h de exposição aos contaminantes, os macrófagos foram incubados com leveduras numa relação de (1:10), respectivamente, durante 15 min (BUSSOLARO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS para remoção das leveduras não fagocitadas. Em seguida, foram fixadas em etanol 95%, coradas com Giemsa (Merck®) e analisadas sob microscópio de campo claro. Em cada lamínula, foram analisados no mínimo 25 campos sob objetiva de imersão, e em cada campo analisadas aproximadamente 25 células, resultando em mais de 500 células analisadas por lamínula/grupo para o cálculo do índice fagocítico a partir das seguintes equações (BUCHI e DE SOUZA, 1992):

$$\%Ma = Ma / Mt$$

$$I.E. = Mi / Ma * \% Ma$$

Onde:

I.E. = índice endocítico

Mi = nº de microrganismos internalizados

Ma = nº de macrófagos com microrganismos

Mt = nº total de macrófagos

Os dados também foram normalizados pela viabilidade celular obtidos pelo método do azul de tripan, de forma a minimizar a interferência da redução da viabilidade de alguns grupos sobre o ensaio.

3.12 Análises dos dados

Foram realizados no mínimo três experimentos independentes para todos os ensaios. Os dados obtidos foram analisados com o emprego de Análise de Variância de uma Via (*one-way ANOVA*) seguida, quando aplicável, dos pós-testes de Tukey e Dunnett's.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das nanopartículas

A caracterização das nanopartículas revelou a presença de partículas com tamanho superior a 100 d.nm (nanômetros de diâmetro) para as três concentrações, entretanto, com ocorrência maior na suspensão preparada em água, em relação à preparada em meio de cultura (Figura 02).

Com relação às suspensões preparadas em água, na de menor concentração (N1), 72% das partículas apresentaram tamanho médio entre 980 d.nm e 4300 d.nm, e 23% de partículas com tamanho médio de 7 d.nm, corroborada pelo Índice de Polidispersão (Pdl) de 0,915; Potencial Zeta de -30,2 mV.

Na concentração intermediária (N2), 56% das partículas apresentaram tamanho médio de 405 d.nm, no entanto 36% apresentavam tamanho inferior a 100nm. O Pdl foi de 0,769 e o Potencial Zeta +8,45 mV.

Já na suspensão de maior concentração (N3), três picos de tamanho foram encontrados, contudo, 81% das partículas apresentando tamanhos médios entre 125 d.nm e 1208 d.nm, e apenas 13% de nanopartículas com diâmetro de 13 nm. Essa inconstância no tamanho das partículas é também definida pelo Pdl de 0,891 e pelo Potencial Zeta de +21,2 mV.

Nas suspensões preparadas em meio de cultura, a de menor concentração (N1) apresentou 33,1% de partículas com tamanho médio de 377 nm e 62% de partículas com tamanho variando entre 11 e 55 d.nm, tendo Pdl de 0,727 e Potencial Zeta de -10,2 mV.

A suspensão de concentração intermediária (N2) apresentou 48,4% de partículas com tamanho de 141,4 d.nm e 51,6% de partículas com tamanhos compreendidos entre 9,1 e 28,3 d.nm. Seu Pdl foi de 0,35, e Potencial Zeta de -9,95 mV.

A suspensão mais concentrada (N3) demonstrou um aumento na agregação das nanopartículas, em relação às concentrações inferiores, visto que 71% das partículas apresentaram tamanho de 111,2 d.nm e apenas 27% das partículas exibiram dimensões nano (17,95 d.nm). Consequentemente, o Pdl aumentou para 0,538 e o Potencial Zeta foi de -11,3 mV.

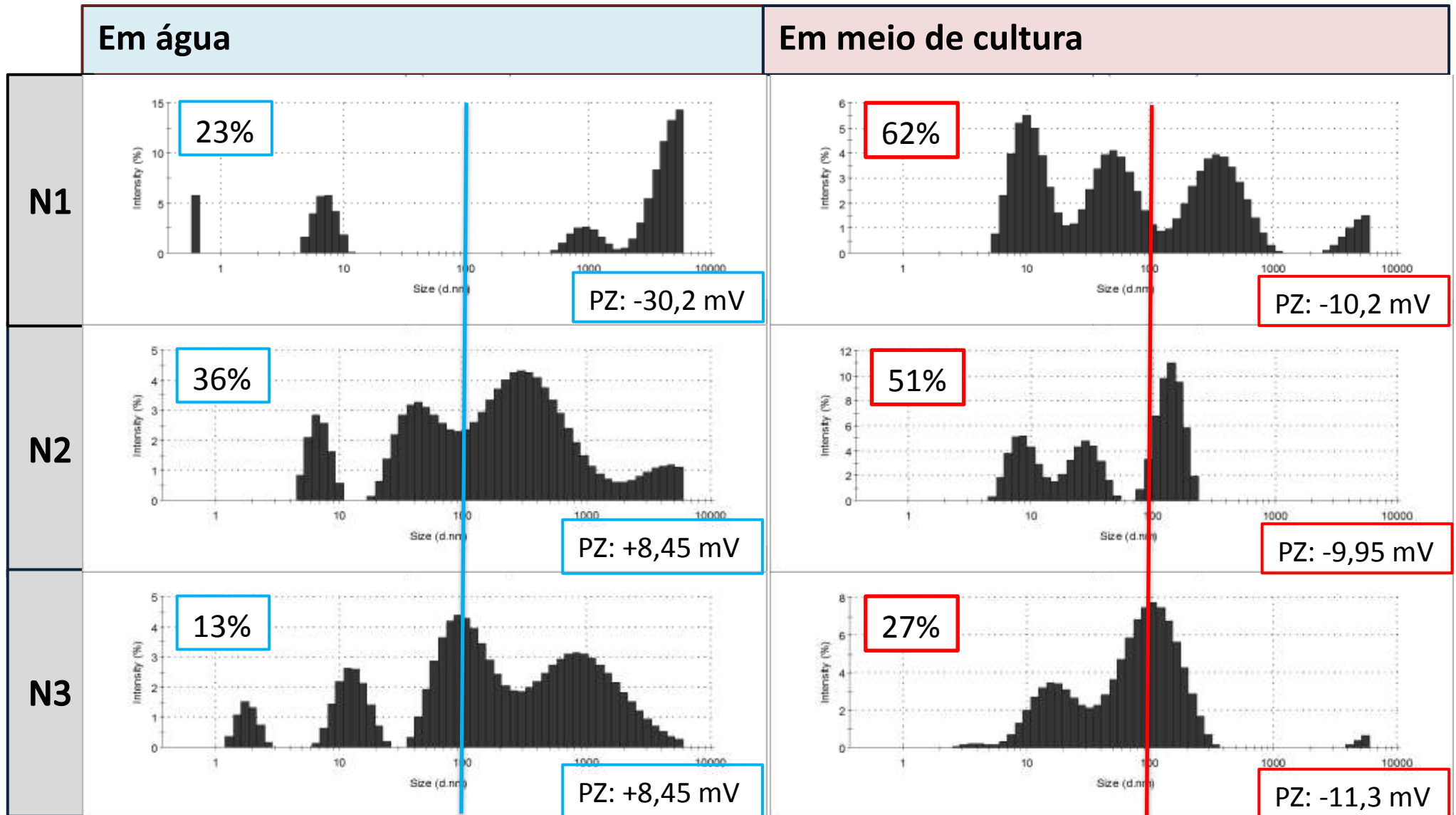


Figura 02. Distribuição do tamanho das nanopartículas de prata em *zetasizer*. Valores percentuais correspondem a quantidade de material particulado menor que 100 nm. PZ= Potencial Zeta

4.2 Viabilidade Celular

4.2.1 Exclusão do Azul de tripan

A viabilidade celular dos macrófagos, visualizados pelo método de exclusão do azul de tripan, demonstrou que houve uma diminuição de viabilidade celular bastante significativa, de 40%, no grupo exposto à maior concentração de nanopartículas isoladas (N3) em relação ao grupo controle, e a viabilidade diminuiu em 53% em relação ao grupo controle quando há associação com os pesticidas organoclorados na maior concentração (grupo N3P2); O grupo N3P2 ainda demonstrou redução de viabilidade quando comparado ao grupo N3 e ao grupo N3P1. (Figuras 03 e 04).

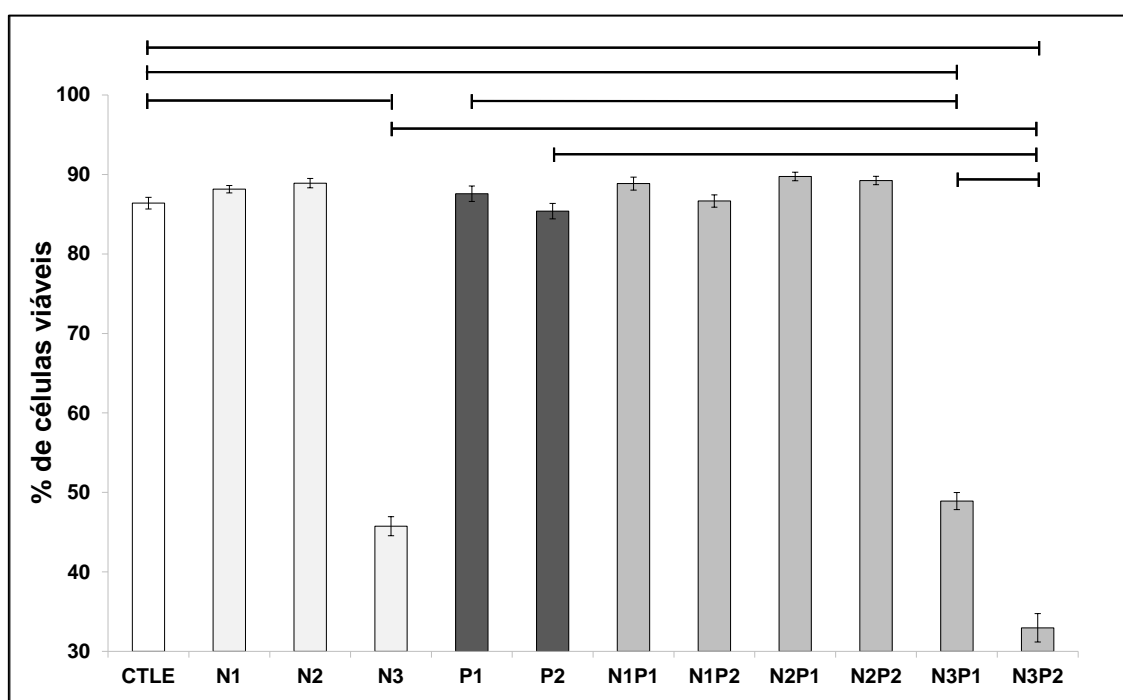


Figura 03. Viabilidade celular utilizando o método de exclusão de Azul de tripan após 24h de exposição aos poluentes. (% de células viáveis). Média ± erro padrão. As linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os grupos. $p < 0,0001$.

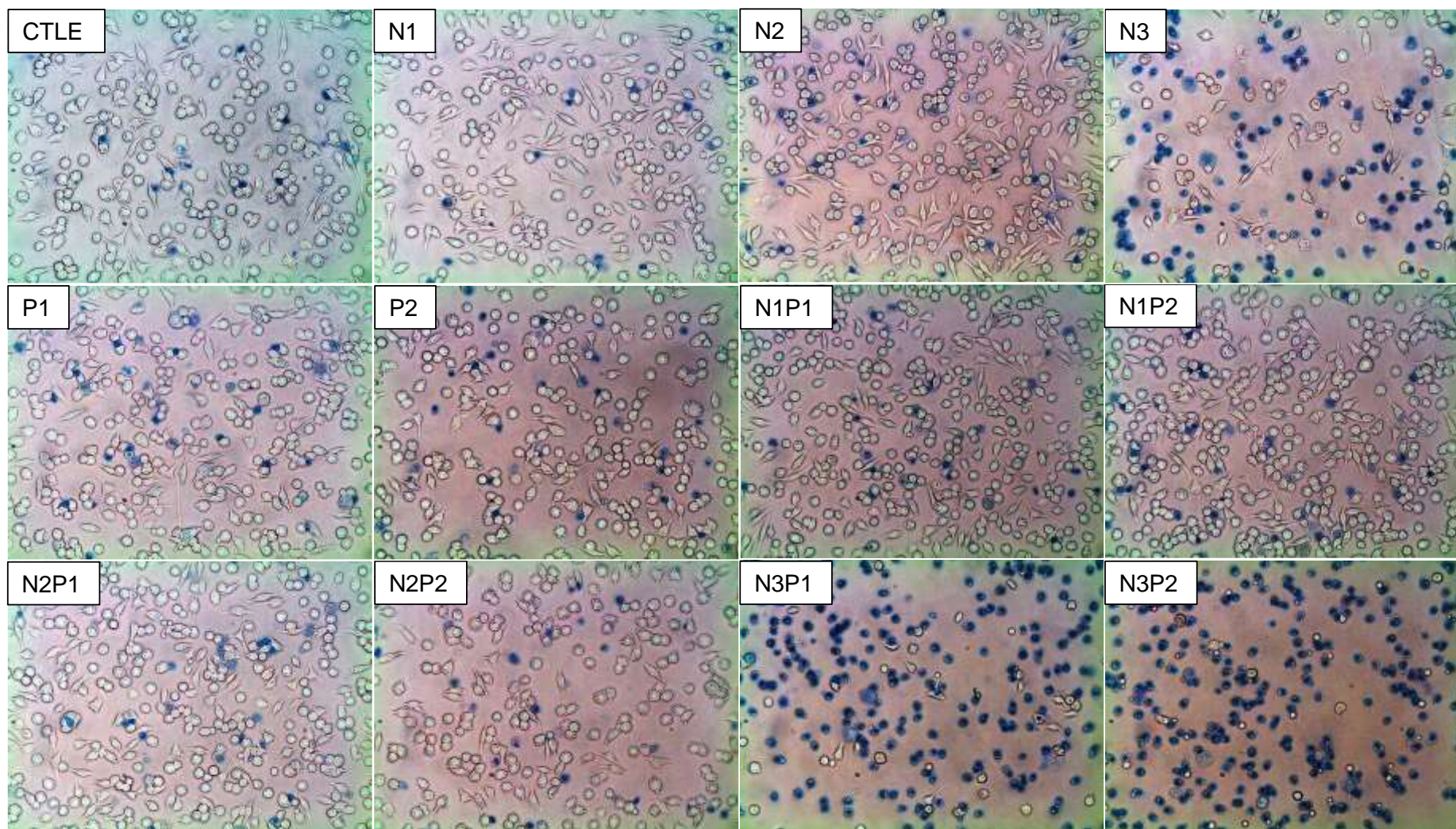


Figura 04. Viabilidade celular através do método de exclusão de Azul de tripan após 24h de exposição. Células coradas de azul – células não viáveis. Aumento:100X

4.2.2 Incorporação e retenção do Vermelho Neutro

Os grupos expostos às concentrações intermediária (N2 – 58%) e maior de nanopartículas de prata isoladas (N3 – 60%) e associada aos pesticidas na maior concentração (N3P2 – 57%) apresentaram uma menor retenção do corante vermelho neutro em comparação ao grupo controle (100%). O grupo exposto às nanopartículas em maior concentração (N3) também apresentou uma menor retenção em relação à associação (N3P1 – 90%). De maneira semelhante, o grupo exposto aos pesticidas na menor concentração (P1 – 91%) teve uma retenção menor em relação à associação com as nanopartículas em concentração intermediária (N2P1 – 106%) (Figura 05).

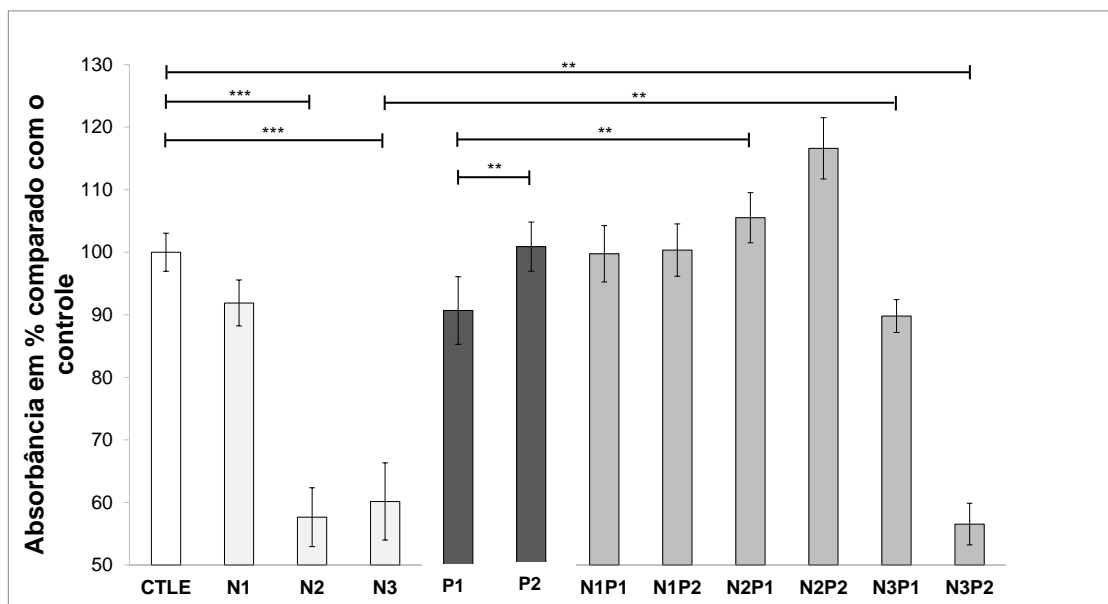


Figura 05. Viabilidade celular utilizando o método de retenção do Vermelho Neutro após 24h de exposição. Média \pm erro padrão. As linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os grupos. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

4.2.3 MTT

Houve diminuição da viabilidade celular dos grupos expostos a maior concentração de nanopartículas de prata isoladas (N3 – 62%) ou em associação com os pesticidas (grupos N3P1- 74% e N3P2 – 66%) em relação ao grupo controle (100%). Da mesma forma, houve diminuição da viabilidade do grupo exposto à mistura N3P1 em relação ao grupo exposto somente ao pesticida P1 (109%). Igualmente o grupo exposto à mistura N3P2 teve sua

viabilidade diminuída em relação ao grupo exposto ao pesticida P2 de forma isolada (115%) - Figura 06.

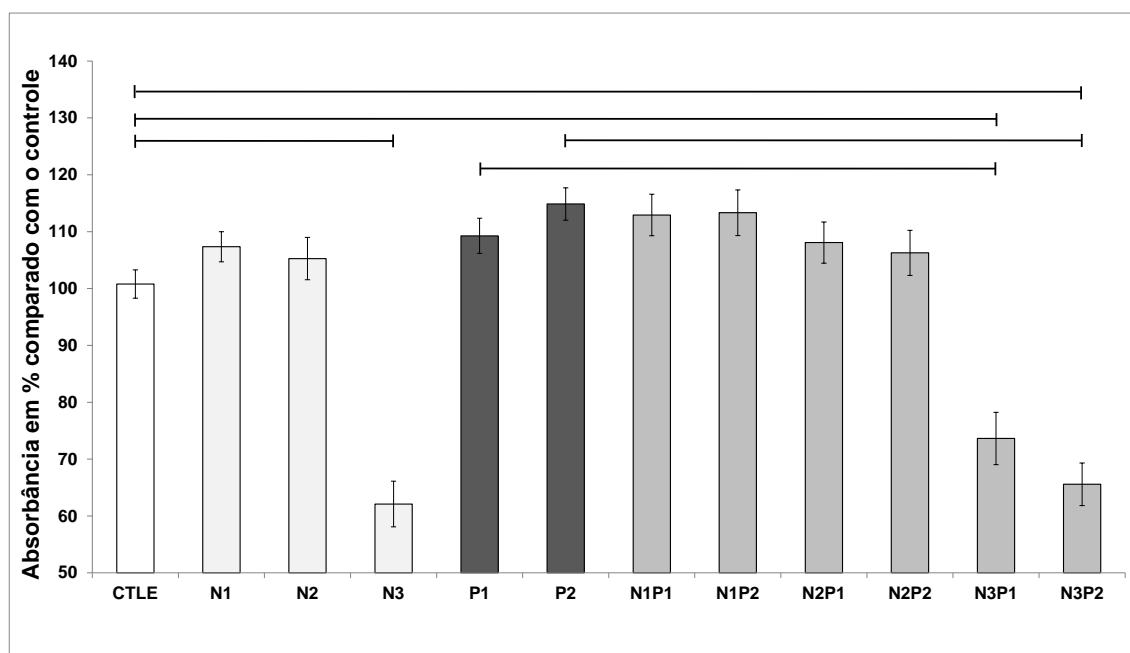


Figura 06. Viabilidade celular utilizando o método MTT após 24h de exposição. Média \pm erro padrão. As linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os grupos. $p < 0,0001$.

O processo de incorporação de MTT e a acumulação de cristais de formazam reduzido foram claramente observados por microscopia de luz, gerando mudança no aspecto dos macrófagos como podemos visualizar na Figura 07.

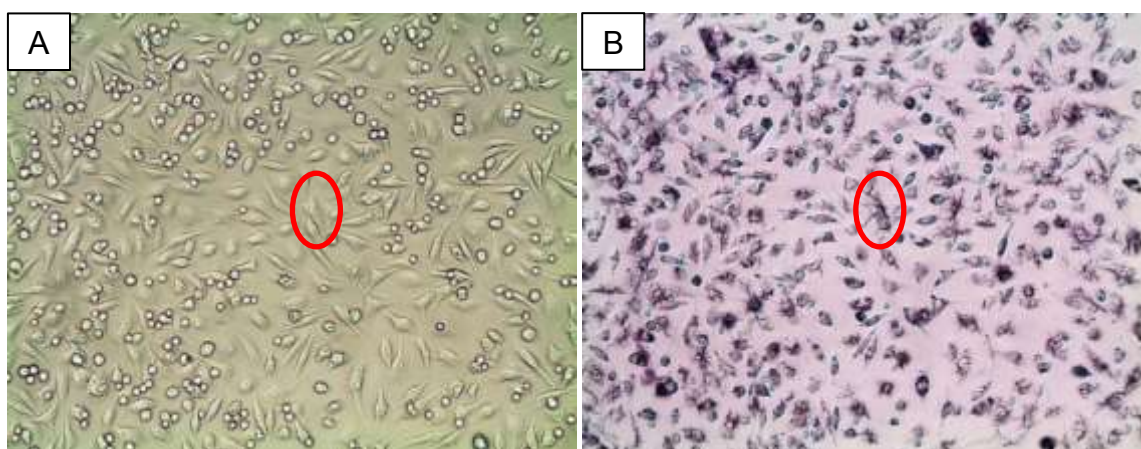


Figura 07. Acúmulo de sais de formazam em macrófagos peritoneais. Observar a mudança de aspecto das células. Em A: tempo 0; Em B: após 3 horas de incubação com MTT. Grupo - controle. Aumento: 100X

4.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) se apresentaram diminuídos nos grupos expostos à associação das nanopartículas com os pesticidas (grupos N3P1- 68% e N3P2 – 82%) em relação ao grupo controle (100%). Houve diminuição dos níveis detectados de EROs do grupo exposto à mistura N3P1 em relação aos grupos expostos somente aos poluentes de forma isolada (grupos N3 - 96% e P1 – 103%). Igualmente o grupo exposto à mistura N3P2 apresentou níveis de produção de EROs baixos se comparado ao grupo exposto somente ao pesticida na mesma concentração (P2 – 114%) - Figura 08.

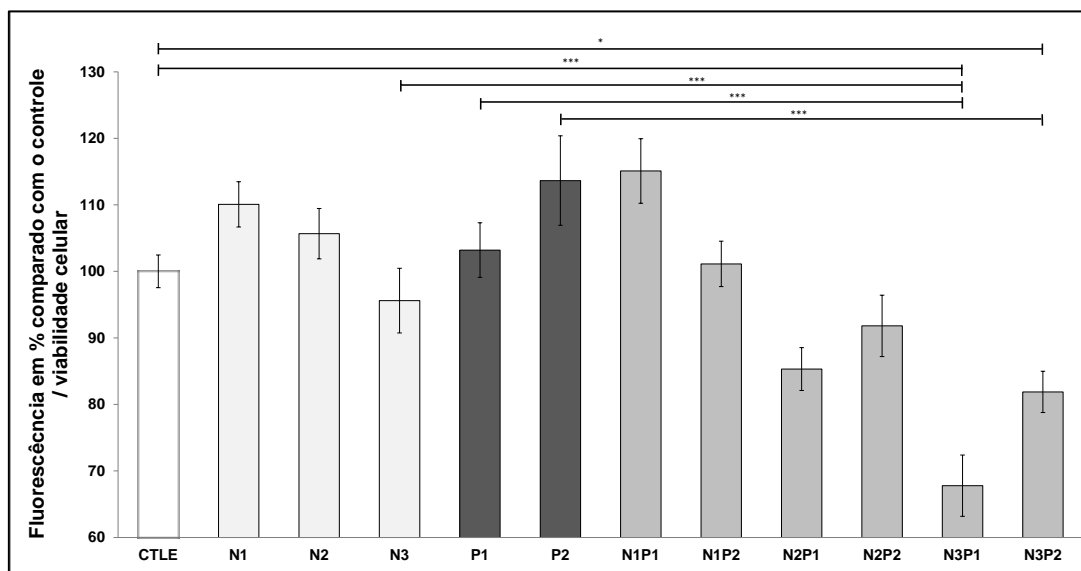


Figura 08. Níveis de EROs liberados após 24 h de exposição. Média \pm erro padrão. As linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os grupos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$.

4.4 Detecção de Óxido Nítrico (NO)

Um aumento bastante significativo dos níveis de óxido nítrico foi encontrado nos grupos expostos a maior concentração de nanopartículas de prata, isoladas ou em associação com os pesticidas (grupos N3, N3P1 e N3P2) em comparação com o grupo controle. Houve aumento dos níveis de óxido nítrico do grupo exposto à mistura N3P1 em relação ao grupo exposto somente aos pesticidas (P1). Da mesma forma, os níveis de óxido nítrico do grupo N3P2 foram superiores em relação aos níveis dos grupos expostos aos pesticidas (P2) e as nanopartículas (N3) de maneira isolada. Analisando as duas

associações de poluentes de maiores concentrações (N3P1 e N3P2) nota-se um efeito mais pronunciado em N3P2. Neste grupo, a associação entre ambos os contaminantes gerou um efeito consideravelmente maior que a exposição aos contaminantes isolados (44% maior que N3) (Figura 09).

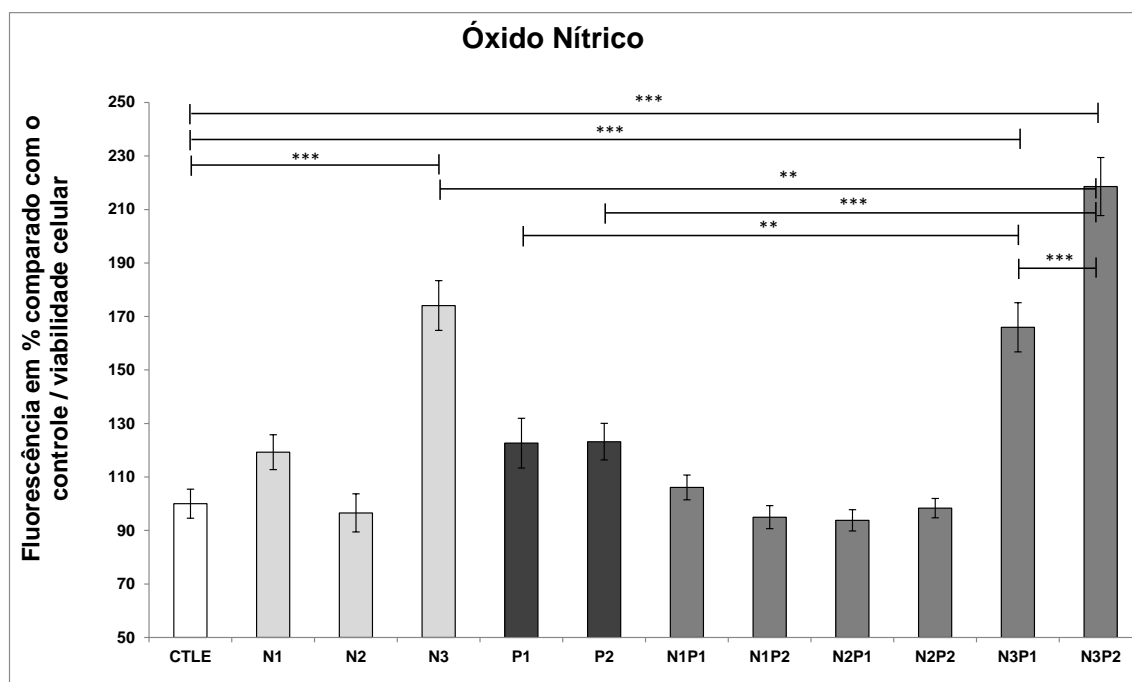


Figura 09. Níveis de NO liberados após 24 h de exposição. Média \pm erro padrão. As linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os grupos. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$).

4.5 Atividade fagocítica

Houve uma diminuição da atividade fagocítica nos grupos expostos à N3P1 e N3P2 superior a 30% em relação ao grupo controle. De maneira mais acentuada o índice diminui no grupo N3, em relação ao grupo controle, mesmo após normalização pela viabilidade celular para minimizar o efeito da perda de viabilidade (Figura 10). O grupo exposto à mistura de menor concentração de ambos os poluentes (N1P1) teve a atividade fagocítica aumentada em 35% em relação ao controle.

Observou-se durante a análise, ao microscópio, que as células do grupo N3 apresentavam os núcleos bastante heterocromáticos em relação ao do grupo controle (Figura 11), o que indica que essas células estavam morrendo e por isso poucas células ainda mantinham atividade fagocítica.

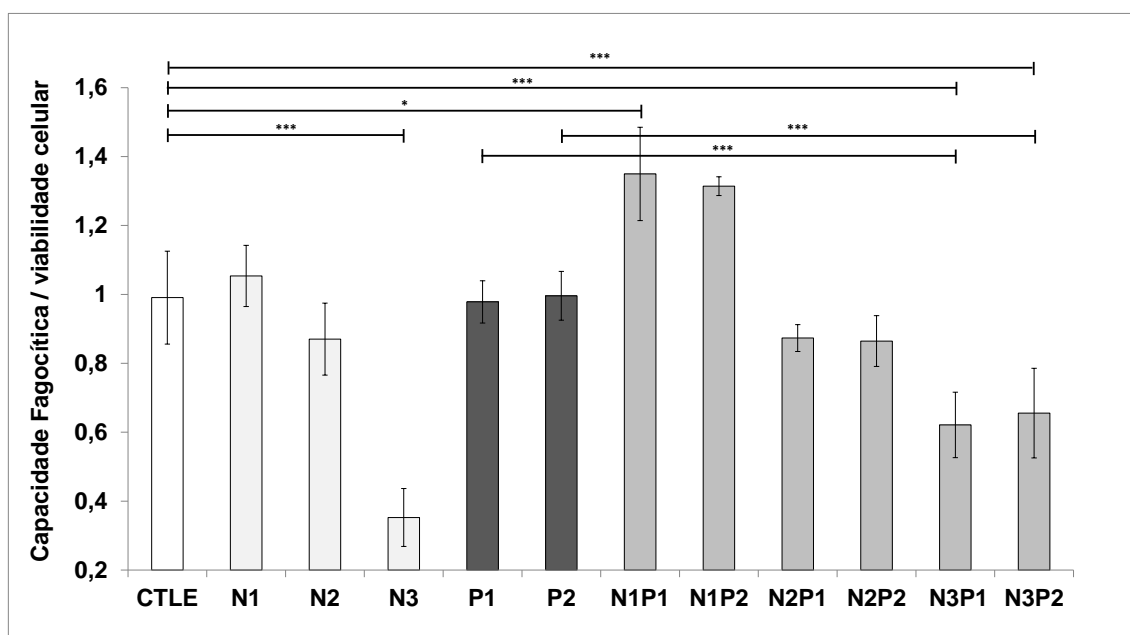


Figura 10. Índice da atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais de camundongo na presença de leveduras, após 24 h de exposição aos poluentes. Média \pm erro padrão. As linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os grupos. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$).

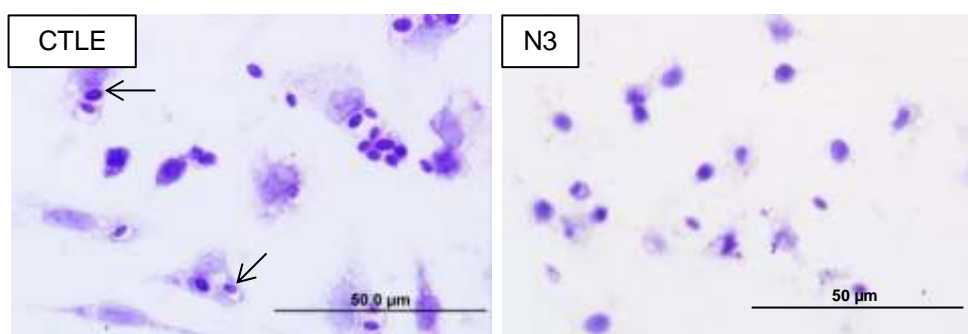


Figura 11. Ensaio de fagocitose após 24 h de exposição aos poluentes. Seta: leveduras no citoplasma.

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV – EDS

As imagens obtidas no microscópio eletrônico de varredura revelaram com um pouco mais de detalhes o que já havia sido detectado sob microscópio de campo claro. Se comparado ao grupo controle, os macrófagos expostos a maior concentração de nanopartículas de prata têm sua área de adesão diminuída. As células expostas à mistura dos poluentes parecem ainda mais danificadas (Figuras 12 e 13).

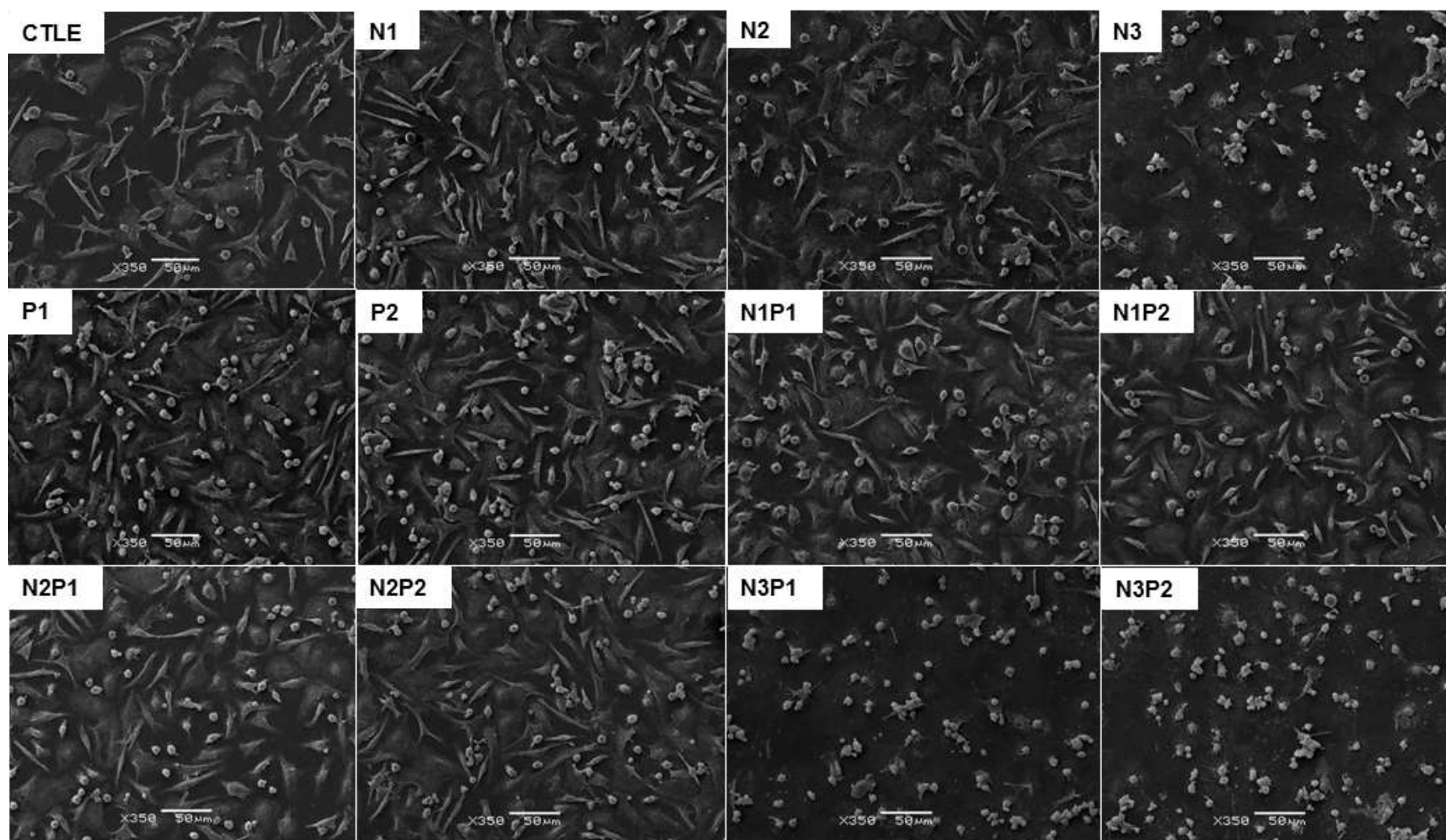


Figura 12. Macrófagos expostos por 24 h observados sob Microscopia Eletrônica de Varredura

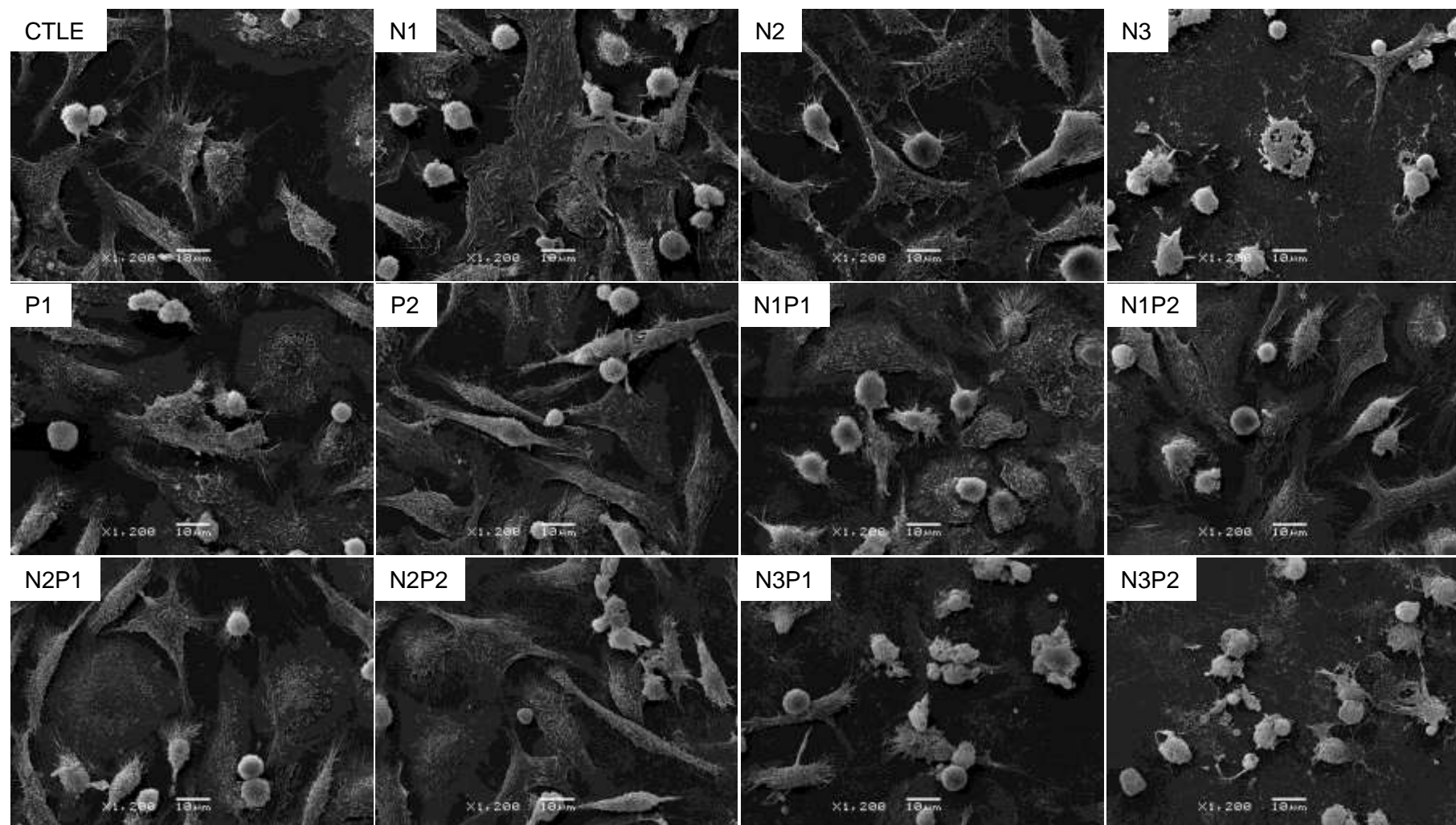


Figura 13. Detalhes da cultura de macrófagos, observados sob Microscopia Eletrônica de Varredura, após 24 h de exposição.

Não foi possível caracterizar as nanopartículas de prata sob MEV, devido ao limite de detecção do equipamento. Todavia, imagens dos agregados das nanopartículas foram obtidas (Figura 14), e foram certificadas pelo sistema EDS (Figura 15). O EDS confirmou a presença de prata, indicando se tratar realmente das nanopartículas; os picos indicando silício e alumínio são do suporte metálico utilizado.

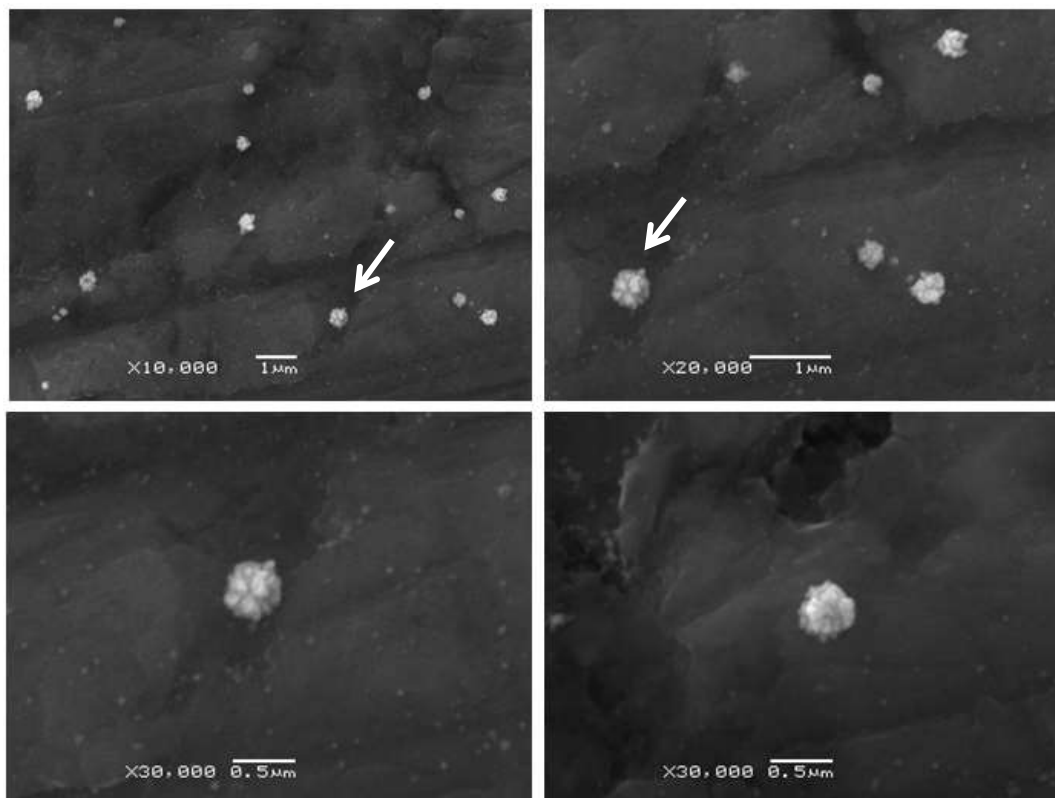


Figura 14. Agregado de Nanopartículas de prata sob Microscopia Eletrônica de Varredura (seta).

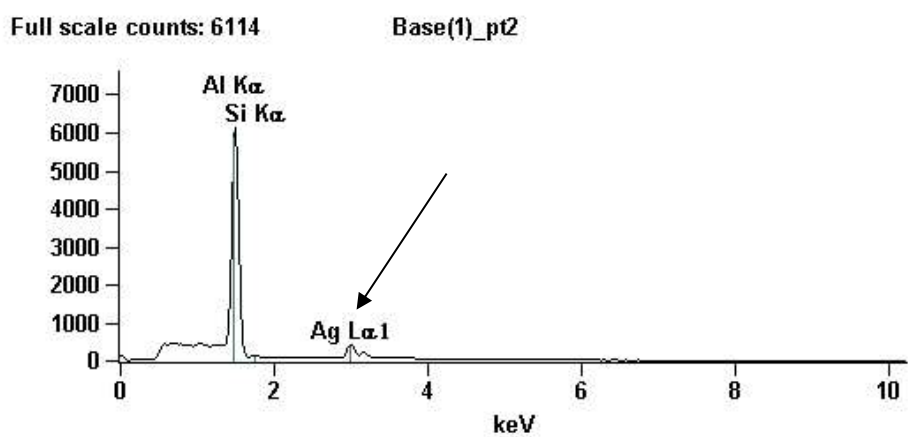
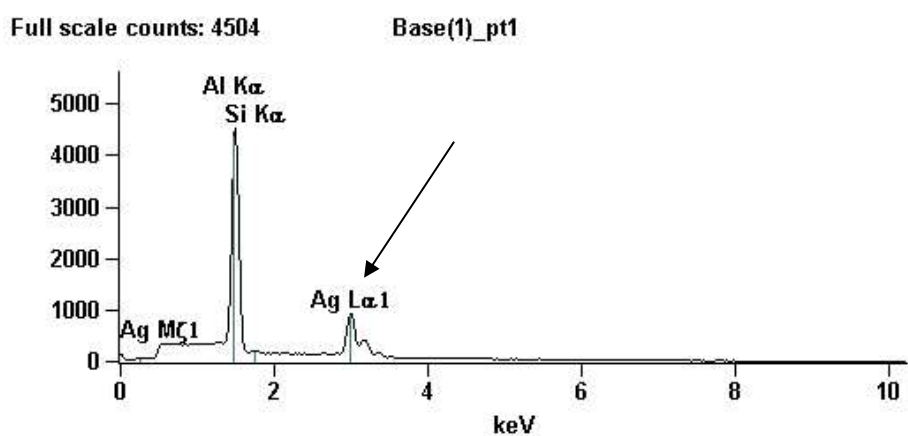
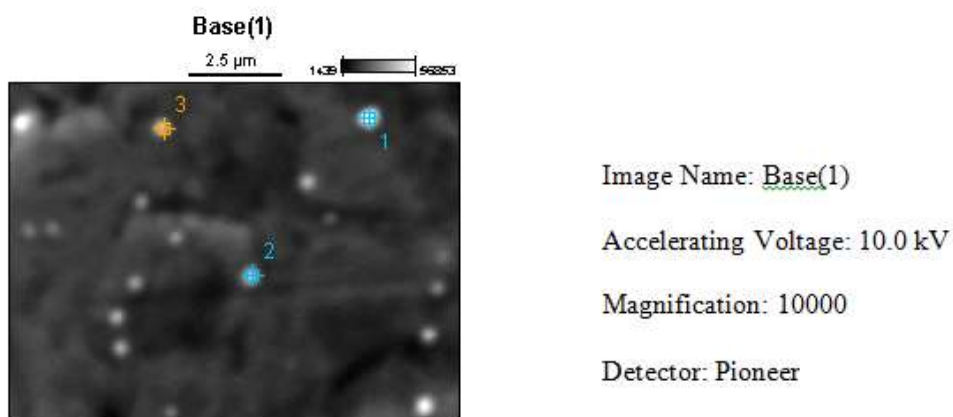


Figura 15. Nanopartículas de prata analisadas com o sistema EDS. Picos de prata (seta). Picos de Al e Si referem-se ao suporte empregado.

4.7 MET

As imagens obtidas sob MET confirmaram a desigualdade de tamanho das nanopartículas, com uma grande quantidade de partículas de tamanhos inferior a 10 nm (Figura 16A). Contudo, também constatou-se partículas de tamanho bastante grande, na ordem de 350-470 nm (Figura 16B).

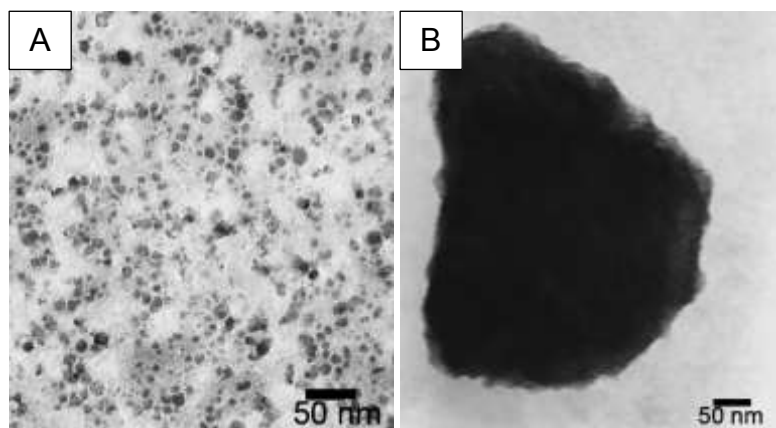


Figure 16. Nanopartículas de prata e agregado de nanopartículas vistos sob MET

As telas preparadas para MET foram analisadas e indícios da presença de nanopartículas de prata foram encontrados como estruturas eletrodensas dentro de vesícula (Figura 17).

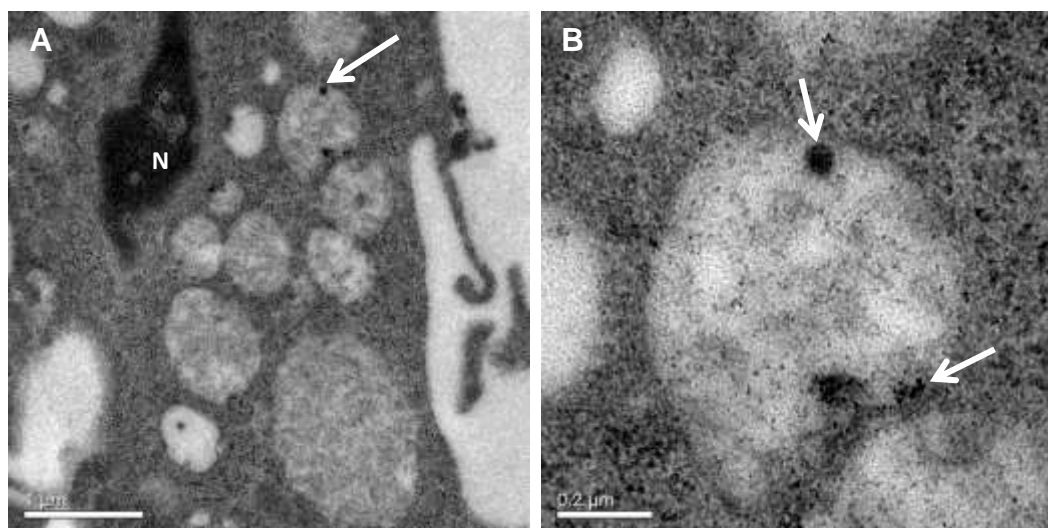


Figura 17. Indícios de Nanopartículas de Prata em macrófagos do grupo N1. **A:** Estrutura eletrodensa no interior da vesícula (seta), Núcleo (N). Detalhe em **B**.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, as nanopartículas de prata estão sendo usadas em muitas aplicações biomédicas devido às suas propriedades antimicrobianas (BURD *et al.*, 2007; JAIN *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011;), além de estarem presentes em produtos como purificadores de água, lavadoras de roupa, peças de vestuário e utensílios domésticos. Essa exposição generalizada à npAg levanta questões sobre a segurança de tais aplicações para saúde (WIJNHOFEN *et al.*, 2009; CHRISTENSEN *et al.*, 2010).

Por isso, os estudos de toxicidade *in vitro* com avaliações de citotoxicidade, diferenças morfológicas, dano em biomoléculas (DNA, fosfolipídios e proteínas), estresse oxidativo e análise de expressão gênica tem se mostrado importantes na área da nanotoxicologia (MARQUIS *et al.*, 2009).

Nesse estudo, as npAg utilizadas foram caracterizadas com relação ao tamanho e também o comportamento destas quando suspensas em água e/ou meio de cultura. Essa análise nos permite afirmar sobre as características da suspensão utilizada, se há presença de nanopartículas e/ou de agregados e inferir a toxicidade potencial que essas apresentavam, pois as propriedades físico-químicas das nanopartículas são essenciais para avaliar a toxicidade potencial das nanopartículas e assegurar a reprodutibilidade dos dados (PARK *et al.*, 2010). Segundo ELSAESSER e VYVYAN HOWARD (2012), um estudo de avaliação toxicológica significativo somente é possível através do conhecimento das propriedades das partículas.

Com os dados do potencial zeta da superfície podemos inferir o grau de aglomeração das nanopartículas, ou a sua ligação a proteínas e consequentemente a citotoxicidade e o processo de endocitose (ROSER, 1998; CHELLAT, 2005). A análise do Potencial Zeta das npAg nos mostraram que as npAg suspensas em água estavam estáveis ou com pequena tendência a agregação em relação às npAg suspensas em meio, que estavam mais sujeitas à agregação. No entanto, Elzey e Grassian (2010) reportaram as tendências de comportamento de nanopartículas de prata em ambientes aquosos, registrando agregação em pH neutro, com tendência para a desagregação em um pH baixo (ácido), liberando partículas isoladas e íons livres de prata, o que poderia

acontecer em caso de endocitose das nanopartículas em compartimentos como endossomos e lisossomos.

O tamanho das nanopartículas é considerado um dos fatores mais importantes que influenciam a toxicidade (LIM *et al.*, 2012) e as interações com sistemas biológicos, além da sua composição, estrutura, forma e revestimento da superfície. A caracterização das partículas demonstrou que as npAg utilizadas nesse trabalho, em sua maior parte, apresentavam tamanhos pequenos (aproximadamente 10 nm), justificando a toxicidade aparente das partículas dispersas. PARK *et al.* (2011), demonstrou na linhagem celular de macrófagos U937, incubada com npAg de dois tamanhos diferentes por 24 h, que as npAg de 5 nm apresentam citotoxicidade em concentrações entre 3,125 e 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e as partículas de 100 nm não provocaram citotoxicidade até 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em outro trabalho, não houve respostas citotóxicas por npAg de 70 nm mesmo em uma concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Acredita-se que a entrada na célula de nanopartículas menores seja mais fácil em comparação com a de partículas maiores, o que necessita ser confirmado por medições quantitativas (PARK, 2011).

Outros autores sugerem que a maior citotoxicidade que partículas menores geram em comparação com partículas maiores está relacionada com a quantidade de EROs geradas, na maior área de superfície relativa das nanopartículas pequenas (CARLSON, 2008; LIU, 2010). Nanopartículas de prata já são bem conhecidas por induzir a produção de EROs (ASHARANI, 2009; ASHARANI, 2009). Essas são geradas como parte do metabolismo oxidativo normal, mas a morte das células ou dano celular pode ocorrer por sua produção demasiada (DROGE, 2003). Quando a produção de EROs supera a capacidade de vias de defesa antioxidante, responsáveis por manter o equilíbrio redox dentro da célula, gera o estresse oxidativo (WELLS *et al.*, 2009). Entretanto, nesse trabalho, não houve estresse oxidativo, e sim a diminuição dos níveis de EROs, fato que também é preocupante, uma vez que nesse tipo celular, esses elementos são necessários para o momento da eliminação de patógenos, via “burst” respiratório.

A geração de EROs também é apontada como um papel importante na apoptose induzida por npAg (CARLSON *et al.*, 2008; ASHARANI *et al.*, 2009; FOLDBJERG *et al.*, 2009). Park (2011) afirma que a apoptose é um dos

primeiros mecanismos para morte de células imune induzida por npAg. Seu estudo demonstrou que o tratamento com nanopartículas de 4 nm ocasionava uma apoptose significativamente maior do que as que eram promovidos por npAg de 20 nm e 70 nm. Efeitos apoptóticos semelhantes de npAg têm sido descritos para outras linhagens celulares, incluindo células NIH3T3 de camundongo, fibroblastos, células do músculo e do cólon. Isso realça os resultados de toxicidade de partículas pequenas e nos faz pensar no mecanismo que isso está acontecendo. As npAg podem causar apoptose por simples geração de ROS, assim como podem causar danos mitocondriais (HSIN et al., 2008; KANG et al., 2011) e até mesmo dano ao DNA (AHAMED et al., 2008; KAWATA et al., 2009).

Quando os macrófagos são ativados por microorganismos patogênicos ou substâncias químicas estranhas, eles produzem vários mediadores imunitários, incluindo uma explosão de óxido nítrico (NATHAN, e XIE, 1994). É uma molécula importante envolvida em muitos processos fisiológicos, que vão desde as respostas imunitárias (MACMICKING *et al.*, 1997), até efeitos patológicos, induzindo a apoptose (ALBINA et al., 1993). Este papel duplo, desempenhado pelo NO, favorecendo a viabilidade celular ou induzindo a morte por apoptose, depende do tipo de célula e da concentração de NO produzida (HORTELANO *et al.*, 1997) O excesso de NO pode causar estresse oxidativo, danos ao DNA, perturbações no metabolismo energético, na homeostase do cálcio e disfunção mitocondrial. Todas estas perturbações podem conduzir a célula à morte por apoptose ou necrose (KERR *et al.*, 1972; HALE *et al.*, 1996; LEIST e NICOTERA, 1997)

Um aspecto importante da atividade de NO como um regulador da sobrevivência e morte celular é a sua influência sobre a função mitocondrial. O óxido nítrico compete com o oxigênio nos sítios de ligação em várias enzimas componentes de vias bioenergéticas, e também afeta a atividade catalítica de complexos formados por grupos heme e ferro-enxofre, presente em proteínas mitocondriais. Além disso, o NO tem a capacidade de diminuir diretamente o potencial de membrana mitocondrial interna e produzir 'inchaço' em mitocôndrias isoladas. Ambos os fenômenos são primeiros passos na apoptose dependente da via mitocondrial (HORTELANO *et al.*, 1997) Estudos já demonstraram que macrófagos tratados com NO exógeno ou liberação de altas

concentrações de NO através da expressão de NOS-2 promoveram a liberação rápida de mediadores apoptóticos, tais como citocromo c, para o citosol (HORTELANO *et al.*, 1997). A partir desses dados, parece evidente uma relação positiva nesse estudo, uma vez que, foi verificado altos níveis de NO nos grupos que tiveram contato com a maior concentração de nanopartículas (grupo N3, N3P1 e N3P2). Nesses mesmos grupos, verificamos uma queda da atividade mitocondrial, vista no ensaio de MTT, e ainda, uma redução na viabilidade celular, demonstrada nos ensaios de exclusão do azul de tripan e retenção do Vermelho Neutro. Sendo assim, é possível que uma alta concentração de AgNP tenha ativado e estimulado a célula a liberar também uma alta concentração de NO, a fim de liquidar com essa substância estranha, que levou a uma disfunção mitocondrial e à morte dessas células.

Outra via de citotoxicidade atribuída ao NO envolve a geração de peroxinitrito, produzido a partir da reação entre NO e o radical livre, ânion superóxido. Esta reação desencadeia respostas celulares que vão desde modulações sutis de sinalização celular até o excesso de lesões oxidativas, levando as células à necrose ou apoptose (WILEY, 2007). Entretanto, nesse trabalho, essa via não parece ter sido a mais expressiva, já que os níveis de EROs (ânion superóxido) se mostraram baixos.

A resposta inflamatória ocorre também em resposta aos estágios iniciais de stress oxidativo (NATHAN, 2003; WELLS *et al.*, 2009). Uma vez que as nanopartículas penetrem as camadas epiteliais de órgãos, tecidos, através da pele e das vias respiratórias, uma resposta de macrófagos é iniciada (GEISER, 2010). Os macrófagos são uma notável e importante exceção, sendo resistentes à morte apoptótica após a ativação. Esta resistência é necessária para permitir que estas células possam desempenhar o seu papel funcional durante as fases iniciais de uma resposta inflamatória. No entanto, após dano cumulativo, ou quando a síntese de mediadores inflamatórios diminui, os macrófagos são submetidos ao programa de morte celular dependente de mitocôndria, contribuindo deste modo para a resolução da reação inflamatória. (BOSCA *et al.*, 2005). No presente estudo, tudo indica que ao encontrar altas concentrações de nanopartículas, os macrófagos entraram no processo de morte celular, todavia em concentrações relativamente baixas os macrófagos foram ativados, evidente na imagens de MEV.

Recentemente, estudos de cinética e distribuição de nanopartículas de prata de três tamanhos diferentes em ratos demonstraram que após 28 dias de administração intravenosa as partículas foram distribuídas principalmente para os órgãos que contêm números elevados de células fagocíticas, tais como fígado, baço e pulmão (LANKVELD, 2010). Isso não é surpreendente, uma vez que estes tipos de células têm uma função importante na remoção de partículas estranhas do corpo. Os resultados de MET também demonstram que os macrófagos internalizaram as nanopartículas, até mesmo na menor concentração de nanopartículas.

Das concentrações utilizadas nesse trabalho, a que induziu citotoxicidade, e alteração dos parâmetros investigados foi muito mais elevada do que aquelas relatadas para atividade antimicrobiana. Isto indica que, em princípio, pode existir uma margem de segurança entre a exposição para aplicação antimicrobiana de nanopartículas de prata e efeitos adversos observados nas células humanas. Entretanto, antes que se possam extrair conclusões mais incisivas são necessários dados de exposição em longo prazo e acumulação de nanopartículas de prata no corpo, uma vez que, também verificou-se que os efeitos tóxicos da associação de nanopartículas de prata com os pesticidas organoclorados são potencializados em relação à exposição isolada a esses poluentes.

6 CONCLUSÕES

- As nanopartículas se apresentaram parcialmente dispersas com mais de 55% do material com tamanho inferior a 100 nm.
- Houve redução da viabilidade celular nos grupos expostos a nanopartículas de prata na maior concentração, de forma isolada ou associada aos pesticidas organoclorados (N3, N3P1 e N3P2) nos três ensaios de viabilidade empregados. Entretanto, a associação dos poluentes demonstrou ser mais citotóxica quanto à integridade da membrana plasmática (ensaio do azul de tripan) em comparação a exposição aos xenobióticos isolados;
- Houve diminuição das espécies reativas de oxigênio e aumento dos níveis de óxido nítrico nos grupos N3, N3P1 e N3P2;
- Os macrófagos tiveram a atividade fagocítica diminuída nos grupos N3, N3P1 e N3P2, e aumentada após exposição a N1P1.
- As nanopartículas de prata na maior concentração (N3) causaram redução da viabilidade celular, redução da atividade fagocítica, redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, aumento nos níveis de óxido nítrico e alterações morfológicas, aliado à presença de núcleos bastante heterocromáticos. Tais dados são indícios do potencial deletério nas npAg, mesmo que, em concentrações relativamente altas, em relação àquela estimada no ambiente;
- Os resultados obtidos a partir da associação de nanopartículas e pesticidas organoclorados indicaram efeito diferente da exposição isolada.

REFERÊNCIAS

- ABBASSY, M.S., IBRAHIM, H.Z., ABU EL-AMAYEM, M.M.; Occurrence of pesticides and polychlorinated biphenyls in water of the Nile river at the estuaries of Rosetta and Damietta branches, North of Delta, Egypt. **Journal of Environmental Science and Health Part B, Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes** 34, 255-267, 1999.
- AHAMED, M; KARNS, M; GOODSON, M; ROWE, J; HUSSAIN, SM; SCHLAGER, JJ; DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. **Toxicol Appl Pharmacol**;233(3):404e10; 2008.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed., Artes Médicas. Porto Alegre, 2004.
- ALBINA, J.E., CUI, S., MATEO, R.B., REICHNER, J.S., Nitric oxide mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages, **J. Immunol.** 150, 5080–5085, 1993.
- AL-RAWI, M.; DIABATE, S.; WEISS, C.; Uptake and intracellular localization of submicron and nano-sized SiO₂ particles in HeLa cells, **Arch. Toxicol.** 85, 813–826, 2011.
- ARORA, J.J.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M.; Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. **Toxicol. Lett.** 179, pp. 93–100, 2008.
- ARTELT, S.; CREUTZENBERG, O.; KOCK, H.; LEVSEN, K.; NACHTIGALL, D.; HEINRICH, U.; RUHLE, T.; SCHLOGL, R. Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study. **Sci. Total Environ.**, v.228, p.219–242, 1999.
- ASHARANI PV.; LIANWU Y.; GONG Z.; VALIYAVEETIL, S.; Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, 19, 255102 (8pp), 2008.
- ASHARANI, PV; HANDE, MP; VALIYAVEETIL, S; Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biol**;10:65; 2009.
- ASHARANI, PV; LOW KAH MUN, G; HANDE, MP; VALIYAVEETIL, S; Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**; 3: 279e90; 2009.
- AUGER, M. J.; ROSS, J. A.; The biology of the macrophages. In: The natural immune system: the macrophage. Rds. C. E. Lewis e J.D. Mc Gee, **IRL Press, Oxford**, New York, Tokio, p. 1-57, 1992.
- BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**, v.109(1) p.33-44, 2000.
- BAIRD C. **Química Ambiental**. 2.ed. Porto Alegre, Bookman, p622, 2002
- BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. F. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Rev. Environ. Health.**, v.16, p.1-40, 2001.
- BAUN, A.; SORENSEN, S. N.; RASMUSSEN, R. F. ; HARTMANN, N. B.; KOCH, C. B. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. **Aquatic Toxicology**, v. 86, p.379-387, 2008.

BENOV, L.; SZTEINBERG, L.; FRIDOVICH, I.; Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.826-831, 1998

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, Elmsford, v. 40, p. 845-859, 2004.

BHABRA, G.; SOOD, A.; FISHER, B.; CARTWRIGHT, L.; SAUNDERS, M.; EVANS, W.H.; SURPRENANT, A.; LOPEZ-CASTEJON G.; MANN, S.; DAVIS, S.A.; HAILS, L.A.; INGHAM, E.; VERKADE, P.; LANE, J.; HEESOM K.; NEWSON, R.; CASE, C.P.; Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier, **Nat Nano**, 4, 876–883, 2009.

BLUS, L. J. **Organochlorine Pesticides**. In. **Handbook of Ecotoxicology**. Eds: HOFFMANN, D.J.; RATTNER, B. A.; BURTON JR, G.A.; CAIRNS Jr, J.pp. 275-300,1995.

BONFOCO, E.; KRAINIC D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A.; Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with Nmethyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92, 7162-7166, 1995.

BOSC´A, L., ZEINI, M., TRAV´ES, P.G., HORTELANO, S., Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. **Toxicology** 208,249–258, 2005.

BUCHI, D.F., DE SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, 24, 135–141, 1992.

BURD, A.; KWOK, CH.; HUNG, SC.; CHAN, HS.; GU, H.; LAM, WK.; A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. **Wound Repair Regen**; 15:94e104, 2007.

BUSSOLARO, D.; **Efeitos *in vitro* do chumbo inorgânico [Pb(II)] na resposta imunitária de macrófagos peritoneais de camundongo**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, 2006.

BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; GARGIONI, R.; FERNANDES L.C.; RANDI, M.A.F.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; The immune response of peritoneal macrophages due to exposure to inorganic lead in the house mouse *Mus musculus*. **Toxicology in Vitro**, 22, 254–260, 2008.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Flighiting the stranger-antioxidante protection against endotoxin toxicity, **Toxicology**, p. 45-63, 2002.

CALDAS, E.D., COELHO, R., SOUZA, L.C.K.R., SILVA, S.C. Organochlorine pesticides in water, sediment and fish of Pavana Lake of Brazilia, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Ecotoxicology**, 62,199-206, 1999.

CARLSON, C.; HUSSAIN, S. M.; SCHRAND, A. M.; BRAYDICH-STOLLE, L. K.; HESS, K. L.; JONES, R. L.; SCHLAGER, J. J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. **J. Phys. Chem. B.**, v.112, p.13608-13619, 2008.

CARVALHO, F.P.; MONTENEGRO-GUILLEN, S.; VILLENEUVE, J.P.; CATTINI, C.;BARTOCCI, J.; LACAYO, M.; Chlorinated hydrocarbons in coastal lagoons of the Pacific coast of Nicaragua. **Arch. Environ. Contam.Toxicol.**,36, 132±139, 1999.

CHELLAT, F.; MERHI, Y.; MOREAU, A.; YAHIA, L.; **Biomaterials**, 26, 7260, 2005.

CHENG H.; ZHANG G.; JIANG J.X.; LI X.; LIU X.; LI J.; ZHAO Y.; Organochlorine pesticides, polybrominated biphenyl ethers and lead isotopes during the spring time at the Waliguan Baseline Observatory, northwest China: Implication for long-range atmospheric transport. **Atmos. Environ.**, 41, 4734–4747, 2007.

CHRISTENSEN, FM; JOHNSTON, HJ; STONE, V; AITKEN, RJ; HANKIN, S; PETERS, S; Nano-silver e feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. **Nanotoxicology**; 4(3):284e95; 2010.

DALE, C.D.; BOXER, L.; LILES, W. C.; The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v.112, p.935-945, 2008.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O.; **DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano): Toxicidade e Contaminação Ambiental - Uma Revisão.**? Química Nova, v. 25, n. 6, p.995 - 1002, 2002.

DROGE, W.; Oxidative stress and aging. **Adv Exp Med Biol**;543:191e200; 2003.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre o óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 04, p. 343-350, 2003.

ELSAESSER, A.; VYVYAN HOWARD, C.; Toxicology of nanoparticles; **Advanced Drug Delivery Reviews** 64, 129–137, 2012.

ELZEY, S.; GRASSIAN, V.H.; Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. **JNanopart Res.**, 12, 1945-195, 2010.

EPA U.S.; State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More, **U.S. Environmental Protection Agency**, Washington, 2010.

ERWIG, L. P. et al. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **Journal Immunology**, Baltimore,v.161, n.4, p.1983-8, 1998.

FAUSS, E. The Silver Nanotechnology Commercial Inventory.**University of Virginia**. <http://www.nanoproject.org>. 2008.

FILIPAK NETO, F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; ALVES COSTA; J R.M.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. **Toxicol. In Vitro**, v.21, p.706-715, 2007

FOLDBJERG, R.; OLESEN, P.; HOUGAARD, M.; DANG, D.A.; HOFFMANN, H.J.; AUTRUP, H.; PVP coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicol Lett**;190(2):156 e 62. 2009.

FOLEY, S.; CROWLEY, C.; SMAIHI, M.; BONFILS, C.; ERLANGER, B.F.; SETA, P.; LARROQUE, C.; Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 294, 116–119, 2002.

FORMAN, H. J.; TORRES, M.; Redox signaling in macrophages. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p.189-216, 2001.

FUJIWARA, K.; SUEMATSU, H.; KIYOMIYA, E.; AOKI, M.; SATO, M.; MORITOKI, N. Size-dependent toxicity of silica nano-particles to *Chlorella kessleri*. **J. Environ. Sci. Health**, v.43, p.1167-1173, 2008.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L.; Color Textbook of Histology, **Philadelphia**, p. 58-69, 1997.

GEISER, M.; Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. **J Aerosol Med Pulm Drug Deliv**; 23:207e17; 2010.

GINZBURG, V.V.; BALIJEPALLI, S.; Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes, **Nano Lett.**, 7, 3716–3722, 2007.

GODBEY, W.T.; WU, K.K.; MIKOS, A.G.; Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 96, 5177–5181, 1999.

GORDON, S.; PERRY, V.H.; RABINOWITZ, S.; CHUNG, L-P; ROSEN, H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **Journal Cell Science**, suppl. 9, p. 1-26, 1988.

GREULICH, C.; DIENDORF, J.; SIMON, T.; EGGELER, G.; EPPLE, M.; KOLLER, M.; Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells, **Acta Biomater.**, 7, 347–354, 2011.

GUO L., QIU Y., ZHANG G., ZHENG G.J., LAM P.K.S., LI X.; Levels and bioaccumulation of organochlorine pesticides (OCPs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fishes from the Pearl River estuary and Daya Bay, South China. **Environmental Pollution**, 152 604e611, 2008.

HALE, A.J.; SMITH, C.A.; SUTHERLAND, L.C.; STONEMAN, V.E.A.; LONGTHORNE, V.L.; CULHANE, A.C.; WILLIAMS, G.T.; Apoptosis: molecular regulation of cell death, **Eur. J. Biochem.** 236, 1-26, 1996.

HANKS, T.I.; In vitro models of biocompatibility: a review. **Dent. Mater.** 12, 186–193, 1996.

HAUGLAND, R.P.; **Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals**, Molecular Probes, Leiden, 1996.

HORTELANO, S., DALLAPORTA, B., ZAMZAMI, N., HIRSCH, T., SUSIN, S.A., MARZO, I., BOSCA, L., KROEMER, G., Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. **FEBS Lett.** 410, 373–377, 1997.

HOSHINO, A.; FUJIOKA, K.; OKU, T.; NAKAMURA, S.; SUGA, M.; YAMAGUCHI, Y.; SUZUKI, K.; YASUHARA, M.; YAMAMOTO, K.; Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells, **Microbiol. Immunol.**, 48, 985–994, 2004.

HOWARD, C. V. Small particles - big problems. **Int Lab News**, v.2, p. 28–9, 2004.

HSIN, YH.; CHEN, CF.; HUANG, S.; SHIH, TS.; LAI, PS.; CHUEH, PJ.; The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. **Toxicol Lett**; 179:130e9; 2008.

HUNG, H.; HALSALL, C.J.; BLANCHARD, P.; LI, H.H.; FELLIN, P.; STERN, G.; ROSENBERG, B.; Temporal trends of organochlorine pesticides in the Canadian Arctic atmosphere; **Environ. Sci.Technol.** 36, 862–868; 2002.

HUNT, T.K.; HOPT, H.W.; Wound healing and infection, what surgeons and anesthesiologist can do? **Surg. Clin. North Am.** 77, 587–606, 1997.

HURT, R.H.; MONTHIOUX, M.; KANE, A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. **Carbon**, v.44, p.1028–1033, 2006.

HUSSAIN, S.M.; HESS, K.L.; GEARHART, J.M.; GEISS, K.T.; SCHLAGER, J.J.; In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, **Toxicol. In Vitro** 19, 975–983, 2005.

JAIN, J.; ARORA, S.; RAJWADE, JM.; OMRAY, P.; KHANDELWAL, S.; PAKNIKAR, KM.; Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. **Mol Pharm**; 6:1388 e 401; 2009.

JIA, G.; WANG, H.; YAN, L.; WANG, X.; PEI, R.; YAN, T.; ZHAO, Y.; GUO, X.; Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene, **Environ. Sci. Technol.**, 39, 1378–1383, 2005.

KANG, K.; LIM, DH.; CHOI, IH.; KANG, T.; LEE, K.; MOON, EY.; Vascular tube formation and angiogenesis induced by polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles. **Toxicol Lett**; 205:227e34; 2011.

KAWATA, K; OSAWA, M; OKABE, S; In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. **Environ Sci Technol**; 43(15):6046e51; 2009.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R.; Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, **Br. J. Cancer** 26, 239–257, 1972.

KIM, CH.; CHA, SH.; KIM, SC.; SONG, M.; LEE, J.; SHIN, WS.; Silver nanowire embedded in P3HT: PCBM for high-efficiency hybrid photovoltaic device applications. **ACS Nano**; 5:3319 e 25; 2011.

KONER, B. C., BANERJEE, B. D., RAY, A., Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 36, p.395–398, 1998.

KRISHNATRY, A.S.; BRAZEAU, D.A.; FUNG, H. Broad regulation of matrix and adhesion molecules in THP-1 human macrophages by nitroglycerin. **Nitric Oxide**, Orlando, 2009.

LANKVELD, DP; OOMEN, AG; KRYSTEK, P; NEIGH, A; TROOST-DE JONG, A; NOORLANDER, CW; The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. **Biomaterials**; 31(32):8350e61; 2010.

LEIST, M.; NICOTERA, P.; The shape of cell death, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 236, 1-9, 1997.

LIM, DH; JANG, J.; KIM, S.; KANG, T.; LEE, K.; CHOI, IH; The effects of sub-lethal concentrations of silver nanoparticles on inflammatory and stress genes in human macrophages using cDNA microarray analysis. **Biomaterials** 33:4690-4699; 2012.

LIMBACH L.K., WICK P., MANSER P., GRASS R.N., BRUININK A., STARK W.J. **Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress.** *Environ. Sci. Technol.*, 41: 4158–4163; 2007.

LIMBACH, K. L.; LI, Y.; GRASS, R. N.; BRUNNER, T. J.; HINTERMANN, M. A.; MULLER, M.; GUNTHER, D.; STARK, W. J. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblast: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. **Environ. Sci. Technol.** v.39, p.9370-9376, 2005.

LIU, W; WU, Y; WANG, C; LI, HC; WANG, T; LIAO, CY; Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**; 4(3): 319-330; 2010.

LUBICK, Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both?. **Environ. Sci. Technol.**, 42 (23). 8617; 2008.

LUOMA, S. N. Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges?. **Woodrow Wilson International Centre for Scholars: Project on Emerging Nanotechnologies**, Washington, DC, 2008.

MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N.E.; HUKKANEN, M.; MA, G.F.; KONTTINEN, Y.T. Regulation of macrophage activation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, p. 2334-2346, 2003.

MACMICKING, J.; QIAO-WEN, X.; NATHAN, C. Nitric Oxide and Macrophage Function. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 323-350, 1997.

MALVERN; Dynamic Light Scattering: an introduction in 30 minutes. **Technical note.** 2009.

MARQUIS, B.J.; LOVE, S.A.; BRAUN, K.L.; HAYNES, C.L.; Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. **Analyst**, 134, 425–439, 2009.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J. Nutr.**, v. 133, p. 33-940, 2003.

MENOME, M.L.; De MORENO, J.E.A.; MORENO, V.J.; LANFRANCHI, A.L.; METCALFE, L.; METCALFE, C.D.; **Arch Environ. Contam. Toxicol.**, 18, 202, 2000.

MIRANDA, A. L.; ROCHE, H.; RANDI, M. A. F.; MENEZES, M. L.; RIBEIRO, C. A. O.; "Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings." **Environ. Int.** 34(7): 939-949; 2008.

MISKO, T.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W.M.; CURRIE, M.G.; A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples, **Anal. Biochem**; 214, 6–11, 1993.

MUELLER, N.C.; NOWACK, B.; Exposure modelling of engineered nanoparticles in the environment. **Environ. Sci. Technol.** 42 (12), 4447–4453, 2008.

MURAYA, K.A., LOGANATHAN, B.G., KANNAN, K., MCCUMBER KHAN, S., LEE, R.F. Organic and organometallic compounds in estuarine sediments from the Gulf of Mexico (1993-1994). **Estuaries**, 20, 700-709, 1997.

MYLLYNEN, P.; Nanotoxicology: damaging DNA from a distance, **Nat. Nanotechnol.**, 4, 795–796, 2009.

NATHAN, C.; Immunology: oxygen and the inflammatory cell. **Nature**;422:675e6; 2003

NATHAN, C., XIE, Q.W., Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls, **Cell** 78, 915–918, 1994.

NEMMAR, A.; HOET, P.H.M.; VANQUICKENBORNE, B.; DINSDALE, D.; THOMEER, M.; HOYLAERTS, M.F.; VANBILLOEN, H.; MORTELMANS, L.; NEMERY, B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. **Circulation** 105, 411–414, 2002.

NEWSOME, W.H., DAVIES, D.J., SUN, W.F.; Residues of polychlorinated biphenyls (PCB) in fatty foods of the Canadian diet. **Food Additives and Contaminants**,15, 19-29, 1998.

NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S.; Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death, **Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.** 32, 449- 470, 1992.

NOBLE, A. Partition coecients(n-octanol-water) for pesticides. **Journal of Chromatography** p.642, 1993.

NYGREN, H.; BROBERG, M.; ERIKSSON, C.; SAHLIN, H.; YAHYAPOUR, N. Therespiratory burst response of surface-adhering leukocytes. A key to tissueengineering. **Colloids and Surfaces**, vol. 22, p. 87-97, 2001.

OBERDÜRSTER, G.; Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series A: Mathematical, **Phys. Eng.Sci.**, 358, 2719–2740, 2000.

OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA, S. M.; GOES, V. M.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; BUCHI, D. F. Gene expression profiling of macrophages following mice treatment with an immunomodulator medication. **J CellBiochem**; 104: 1364 - 1377, 2008.

OLIVEIRA, S. M.; OLIVEIRA, C. C.; ABUD, A.P. R.; GUIMARÃES, F.S.F.;BERNARDI, R. P.; COLETTI, E.; BUCHI, D. F., Mercurius solubilis: action son macrophages. **Homeopathy**; 100, 228 e 236 ,2011.

PANTE, N.; KANN, M.; Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of 39 nm, **Mol. Biol. Cell** 13, 425–434, 2002.

PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S.; **Ciência, Higiene e tecnologia da carne**. EDUFF-UFG: Goiânia, 1993.

PARFENOV, A.S.; SALNIKOV, V.; LEDERER, W.J.; LUKYANENKO, V.; Aqueous diffusion pathways as a part of the ventricular cell ultrastructure, **Biophys. J.** 90, 1107–1119, 2006.

PARK, E.J.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; PARK K.; Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. **Toxicology in Vitro**, 24, 872–878, 2010.

PARK, J.; LIM, D.H.; LIM, H.J.; KWON, T.; CHOI, J.S.; JEONG, S.; CHOI, I.H.; CHEON, J.; Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles **Chem. Commun.**, 47, 4382–4384, 2011.

PARK, M.V.D.Z.; NEIGH, A.M.; VERMEULEN, J.P.; DE LA FONTEYNE, L.J.J.; VERHAREN, H.W.; BRIEDÉ, J.B J.; VAN LOVEREN, H.; DE JONG, W.H.; The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. **Biomaterials** 32: 9810e9817; 2011.

PÉREZ, S.; FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p.820-832, 2009.

PHILLIPS, H. J.; Dye exclusions tests for cell viability. In: Tissue Culture, methods and applications, Kruse, J. R.: Patterson, J. R. M. K. (eds). A. P.: **New York**, p. 406-408, 1973.

PILIDIS, G., IOANNIDOU, A.G., SARACI, M., STALIKAS, C.; Determination of organochlorine pesticides and selected heavy metals in Albanian soils. **Fresenius Environmental Bulletin**, 5, 551-556, 1996.

PONG, K. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic Implications for superoxide dismutase mimetics. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 3, p. 127-139, 2003.

POWER, M., ATTRILL, M.J., THOMAS, R.M.; Trends in agricultural pesticide (atrazine, lindane, simazine) concentrations in the Thames Estuary. **Environmental Pollution** 104, 1999.

PRATSINIS, A., HERVELLA, P., LEROUX, J.C., PRATSINIS, S.E., SOTIRIOU, G.A.; Toxicity of Silver Nanoparticles in Macrophages; **Small**, 9, No. 15, 2576–2584, 2013.

QUINETE, N.S.; **Extração de Poluentes organoclorados persistentes em fragmentos remanescentes da Mata Atlântica, RJ: comparação de métodos/Niterói**: [s.n.], 2005.

RABITTO, I.S.; **Avaliação da exposição crônica do Hg e DDTs em *Cichla monoculus* (Cichlidae) e riscos para exposição humana na Amazônia**, Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, 2010.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H.; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v.55, p. 803-808, 1998.

RETH, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. **Nature Immunology**, v. 3, p. 1129–1134, 2002.

REY, L.; **Parasitologia**, 2ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.

RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F.; MARQUES. E. K.; **Mutagenese ambiental**. Ulbra, Canoas, 215 pp. 2003.

RODEA-PALOMARES, I.; BOLTES, K.; FERNANDEZ-PINAS, F.; LEGANES, F.; GARCIA-CALVO, E.; SANTIAGO, J.; ROSAL, R.; Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO₂ nanoparticles using two aquatic microorganisms, **Toxicol. Sci.**, 119 135–145, 2011.

ROSER, M.; FISCHER, D.; KISSEL, T., **Eur. J. Pharm. Biopharm.**; 46, 255; 1998.

ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. RS policy document 19/04. **London: The Royal Society**; p. 113, 2004.

RUDGE, C.V.; SANDANGER, T.; RÖLLIN, H.B.; CALDERON, I.M.; VOLPATO, G.; SILVA, J.L.; DUARTE, G.; NETO, C.M.; SASS, N.; NAKAMURA, M.U.; ODLAND, J.Ø.; RUDGE, M.V. Levels of selected persistent organic pollutants in blood from delivering women in seven selected areas of São Paulo State, Brazil. **Environ Int.**, v.40, p. 162-169, 2012.

SASSADA, M., PABST, M.J., JOHNSTON, JR. R.B. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide producing NADPH oxidase. **J BiolChem.** v.258, n. 16, p. 9631–5, 1983.

SCHADE, G., HEINZOW, B. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in Northern Germany: Current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. **The Science of the Total Environment**, 215, 31e39, 1998.

SHIMADA, A.; KAWAMURA, N.; OKAJIMA, M.; KAEWAMATAWONG, T.; INOUE, H.; MORITA, T. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. **Toxicol.Pathol.**, v.34, p.949–957, 2006.

SONG, J.Y.; HAN, S.K.; SON, E.H.; PYO, S.N.; YUN, Y.S.; YI, S.Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, p. 857-865, 2002.

SOTIRIOU, G. A.; PRATSINIS, S. E.; **Curr. Opin. Chem. Eng.**, 1 ,3 – 10 . 2011.

SOTO, K.; GARZA K.M.; MURR, L.E.; Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials. **Acta Biomater**, 3(3):351e8; 2007.

SPACIE A., MCCATHY L.S., RAND G.M. **Bioaccumulation and bioavailability in multiphase systems.** In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor & Francis, New York, pp.493±521, 2nd Edition, 1995.

STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Molecular responses to enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Hugget, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle J. R. e Bergman, H. L. (Eds.) **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress**. Chelsea: SETAC/Lewis Publishers, p. 235-335. 1992.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; **Imunologia**, Editora Prentice/Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1992.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. K.; WEEKS J. M.; A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 57 20–29, 2004.

TAKENAKA, S.; KARG, E.; ROTH, C.; SCHULZ, H.; ZIESENIS, A.; HEINZMANN, U.; SCHRAMMEL, P.; HEYDER, J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p.547–551, 2001.

TROP, M.; NOVAK, M.; RODL, S.; HELLBOM, B.; KROELL, W.; GOESSLER, W.; Silver coated dressing Acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. **J. Trauma** 60, 648–652. **North Am.** 77, 587–606; 2006.

TURUSOV, V., RAKITSKY, V., TOMATIS, L., Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. *Environ. Health Perspect.* 110, 125–128, 2002.

VASIR, J.K.; LABHASETWAR, V.; Quantification of the force of nanoparticle–cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles, **Biomaterials**, 29, 4244–4252, 2008.

WELLS, P.G.; MCCALLUM, G.P.; CHEN, C.S.; HENDERSON, J.T.; LEE, C.J.; PERSTIN, J.; Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. **Toxicol Sci**; 108:4e18; 2009.

WIJNHOFEN, S.W.P.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; HERBERTS, C.A.; HAGENS, W.I.; OOMEN, A.G.; HEUGENS, E.H.W.; Nano-silver e a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**; 3(2):109e38; 2009.

WILEY, J.W. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. **Neurogastroenterol Motil.** 19(7):541-4, 2007.

WILLIAMS, Y.; SUKHANOVA, A.; NOWOSTAWSKA, M.; DAVIES, A.M.; MITCHELL, S.; OLEINIKOV, V.; GUN'KO, Y.; NABIEV, I.; KELLEHER, D.; VOLKOV, Y.; Probing cell-typespecific intracellular nanoscale barriers using size-tuned quantum dots, **Small** 5, 2581–2588, 2009.

XIA, T.; KOVOCHICH, M.; BRANT, J.; HOTZE, M.; SEMPFF, J.; OBERLEY, T.; SIOUTAS, C.; YEH, J.I.; WIESNER, M.R.; NEL, A.E.; Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm, **Nano Lett.**, 6, 1794–1807, 2006.

ZHU, R.; CHUNG, CH.; CHA, KC.; YANG, W.; ZHENG, YB.; ZHOU, H.; Fused silver nanowires with metal oxide nanoparticles and organic polymers for highly transparent conductors. **ACS Nano**; 5:9877 e 82; 2011.

ZHU, Y.; ZHAO, Q.; LI, Y.; CAI X.; LI, W.; The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylonychia mytilus*, **J. Nanosci. Nanotechnol.**, 6, 1357–1364, 2006.